

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-501933

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成7年(1995)3月2日

| | | | |
|---------------------------|------|---------|-----|
| (51) Int.Cl. ⁶ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I |
| C 1 2 M 1/00 | A | 9050-4B | |
| C 1 2 Q 1/68 | A | 9453-4B | |
| // C 1 2 Q 1/70 | | 9453-4B | |

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願平5-506805
 (86) (22) 出願日 平成4年(1992)10月5日
 (85) 翻訳文提出日 平成6年(1994)4月4日
 (86) 国際出願番号 P C T / N L 9 2 / 0 0 1 7 6
 (87) 国際公開番号 W O 9 3 / 0 7 2 9 2
 (87) 国際公開日 平成5年(1993)4月15日
 (31) 優先権主張番号 9 9 6 4 7
 (32) 優先日 1991年10月4日
 (33) 優先権主張国 イスラエル (I L)
 (31) 優先権主張番号 1 0 2 4 8 6
 (32) 優先日 1992年7月13日
 (33) 優先権主張国 イスラエル (I L)

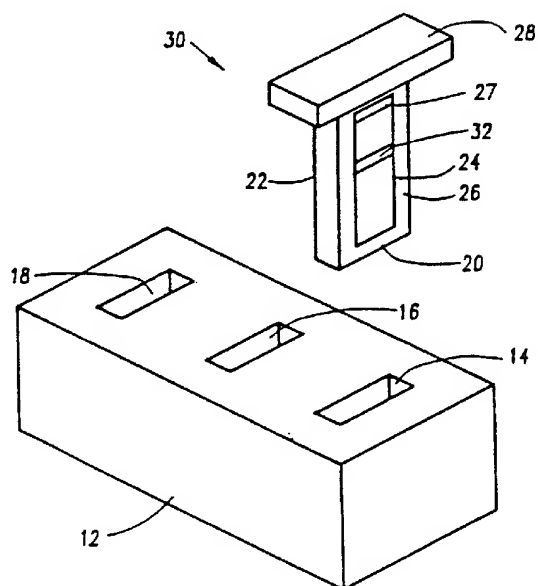
(71) 出願人 オーゲニクス リミティド
 イスラエル国, ヤブネ 70650, インダストリアルゾーン (番地なし), ピー. オー. ボックス 360
 (72) 発明者 レインハーツ, アブラハム
 イスラエル国, レホボット, シャチャー ストリート 1
 (72) 発明者 アライエム, サラー
 イスラエル国, クファー ハナジッド 64
 (72) 発明者 パペール, ティエリー
 フランス国, エフ-75008 パリ, アブニ ユ ダルトワ, 39
 (74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸配列の検出のための方法及び装置

(57) 【要約】

吸水性担体内で核酸配列を含む分子を輸送するための装置であって該分子を含む溶液と接触しているときに、該分子の輸送を補助するキャピラリー輸送経路を規定する乾燥吸水性担体を含んで成る装置。



請 求 の 範 囲

1. 吸水性担体内で核酸配列を含む分子を輸送するための装置であって、該分子を含む溶液と接触しているときに、該分子の輸送を補助するキャピラリー輸送経路を規定する乾燥吸水性担体を含んで成る装置。

2. 液体サンプル中の標的分子の濃縮のための装置であって：

乾燥吸水性担体（ここで、この標的分子は標的核酸配列を含み、そして前記吸水性担体内で、キャピラリー作用により、この乾燥吸水性担体がこの標的分子を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）；及び

前記吸水性担体の接触部分の下流にあるこの乾燥吸水性担体上の少なくとも一捕獲ゾーンにおいて固定化されている少なくとも一捕獲試薬（ここで、この少なくとも一捕獲試薬は標的分子を捕獲することができる）；

を含んで成る請求項1に記載の装置。

3. 標的核酸配列を含む標的分子の、この標的分子と、非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドとを含む液体サンプル中の非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドからの分離のための装置であって：

前記非標的オリゴヌクレオチドに結合する化合物を含む槽；及び
キャピラリー作用により前記槽から前記標的分子を輸送するための手段；

を含んで成る装置。

4. 前記吸水性担体がニトロセルロース膜であり、ここでその吸収部位が前記標的分子のキャピラリー輸送を助長するためにブロックされている、請求項2に記載の装置。

17. 前記少なくとも一対のプライマーのうちの少なくとも第二プライマーが、少なくとも一捕獲試薬に結合するリガンドを抱えるオリゴヌクレオチドを含み、これにより、前記リガンドを抱える前記少なくとも一プライマーを含む前記標的分子が前記少なくとも一捕獲試薬に結合しうる、請求項14に記載の装置。

18. 前記リガンドが抗原性エピトープを含んで成る、請求項17に記載の装置。

19. 前記リガンドが少なくとも一スルホン化シトシンを含んで成る、請求項18に記載の装置。

20. 前記非標的オリゴヌクレオチドが、前記標的核酸配列に一体化されていないオリゴヌクレオチドプライマーを含んで成る、請求項3に記載の装置。

21. 前記化合物が、輸送のための前記手段によって輸送されるのには大きすぎるゲル濾過粒子を含んで成る、請求項3に記載の装置。

22. 前記化合物が、輸送のための前記手段によって輸送されないマトリックスを占めており、そしてここで前記化合物が前記非標的オリゴヌクレオチドとハイブリダイズする、請求項3に記載の装置。

23. 吸水性担体内での核酸配列を含む分子の輸送のための方法であって：

核酸配列を含む分子の輸送を補助するキャピラリー経路を規定する乾燥吸水性担体を用意し；そして

この乾燥吸水性担体を核酸配列を含む分子を含んでいる溶液と接触させること；

の段階を含んで成る方法。

24. 液体サンプル中の、核酸配列を含む分子の濃縮のための方法であって：

乾燥吸水性担体を用意し（ここで、前記分子は、標的核酸配列を

5. 前記吸水性担体が硬質枠により支持されている、請求項4に記載の装置。

6. 前記乾燥吸水性担体伝いの液体のキャピラリー輸送を助長するために、この吸水性担体に、前記少なくとも一捕獲ゾーンの下流にて吸収パッドが固定されている、請求項2に記載の装置。

7. ニトロセルロース膜の前記吸収部位が、巨大分子、清浄剤及びそれらの組合せを含んで成る群から選ばれる化合物によりブロックされている、請求項4に記載の装置。

8. 前記巨大分子がタンパク質を含む、請求項7に記載の装置。

9. 前記少なくとも一捕獲試薬が、前記標的核酸配列の改質部分に対する抗体を含んで成る、請求項2に記載の装置。

10. 前記少なくとも一捕獲試薬が、前記標的核酸配列の少なくとも一部に相補的な核酸プローブ配列を含む少なくとも一核酸捕獲試薬を含んで成る、請求項2に記載の装置。

11. 前記核酸プローブ配列がDNA配列を含む、請求項10に記載の装置。

12. 前記核酸プローブ配列がRNA配列を含む、請求項10に記載の装置。

13. 前記標的分子が30塩基対以上を含んで成る標的核酸配列を含む、請求項1に記載の装置。

14. 核酸配列を含む前記標的分子が、酵素増幅反応の核酸生成物を含んで成り、そして少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマーを一体化せしめている、請求項2に記載の装置。

15. 前記少なくとも一対のプライマーがポリメラーゼ連鎖反応（PCR）のためのプライマーを含んで成る、請求項14に記載の装置。

16. 前記少なくとも一対のプライマーがリガーゼ連鎖反応（LCR）のためのプライマーを含んで成る、請求項14に記載の装置。

含む標的分子であり、そしてここで、前記分子は、この吸水性担体内で、キャピラリー作用により、この乾燥吸水性担体の一部がこの分子を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）；

前記乾燥吸水性担体の一部を、前記標的分子を含む液体サンプルと接触させ（ここでこの乾燥吸水性担体は、濡れているとき、核酸配列を含む分子の輸送を補助する液輸送経路を規定する）；

前記液輸送経路伝いに前記標的分子を輸送し；そして

前記分子を、前記吸水性担体の前記液体と接触している部分の下流にあるこの乾燥吸水性担体上の少なくとも一捕獲ゾーンにおいて固定化されている少なくとも一捕獲試薬により捕獲すること；

の段階を含んで成る方法。

25. 標的核酸配列を含む標的分子の、この標的分子と、非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドとを含む液体サンプル中の非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドからの分離のための方法であって：

前記非標的オリゴヌクレオチドに結合する化合物を含む槽を用意し；

前記標的分子と、前記非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドとを含む液体サンプルを加え；そして

前記分子をキャピラリー作用により輸送すること；

の段階を含んで成る方法。

26. 標的核酸配列を含む標的分子の、この標的分子と、非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドとを含む液体サンプル中の非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドからの分離、この標的分子の濃縮、並びに濃縮標的分子の検出のための装置であって：

前記非標的オリゴヌクレオチドに結合する化合物を含む複数ウェルの第一領域を含む複数のウェルを規定する槽（ここで前記液

体サンプルをこの複数のウェルの第一領域に加えることができる) ;

濡れているときに前記標的分子の輸送を補助する、前記槽からの液輸送経路を規定する乾燥吸水性担体(ここで前記標的分子はこの吸水性担体内で、キャピラリー作用により、この乾燥吸水性担体の接触部分がこの標的分子を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される) ;

前記標的分子を捕獲できる少なくとも一捕獲試薬(ここでこの少なくとも一捕獲試薬は、この吸水性担体の接触部分の下流にあるこの乾燥吸水性担体上の少なくとも一捕獲ゾーンにおいて固定化されている) ; 及び

この捕獲標的分子を検出するための手段 ;

を含んで成る装置。

27. 液体サンプル中の標的核酸配列の濃縮及び検出のための方法であって :

乾燥吸水性担体を用意し(ここで、この標的核酸配列はこの乾燥担体内で、キャピラリー作用により、この乾燥吸水性担体の一部がこの標的核酸配列を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される) ;

前記乾燥吸水性担体の一部を、前記標的核酸配列を含む液体サンプルと接触させ(ここで、この吸水性担体は、濡れているとき、この標的核酸配列の輸送を補助する液輸送経路を規定する) ;

前記標的核酸配列を前記液輸送経路伝いに輸送し ;

前記標的核酸配列を、前記液体サンプルと接触しているこの吸水性担体の部分の下流にあるこの乾燥吸水性担体上の少なくとも一捕獲ゾーンにおいて固定化されている少なくとも一核酸捕獲試薬とのハイブリダイゼーションにより捕獲すること ;

の段階を含んで成る方法。

32. 前記少なくとも一対のプライマーがポリメラーゼ連鎖反応(PCR)のためのプライマーを含んで成る、請求項30に記載の装置。

33. 前記一対のプライマーが、リガーゼ連鎖反応(LCR)のためのプライマーを含んで成る、請求項30に記載の装置。

34. 前記少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマーのうちの第二プライマーが、前記少なくとも一捕獲試薬に結合するリガンドを含み、これにより、このリガンドを含む前記標的分子がこの少なくとも一捕獲試薬に結合しうる、請求項30に記載の装置。

35. 前記リガンドが抗原性エピトープを含んで成る、請求項34に記載の装置。

36. 前記リガンドが少なくとも一スルホン化シトシンを含んで成る、請求項35に記載の装置。

37. 前記少なくとも一対のプライマーのうちの第一プライマーがシグナル生成試薬に結合するリガンドを含み、これにより、このリガンドを含む前記標的分子が、このシグナル生成試薬により生成されるシグナルの存在により検出されうる、請求項30に記載の装置。

38. 前記少なくとも一対のプライマーのうちの第一プライマーがシグナル生成試薬に結合するリガンドを含み、これにより、このリガンドを含む前記標的分子が、シグナル発生剤との接触後にこのシグナル生成試薬により生成されるシグナルの存在により検出されうる、請求項37に記載の装置。

39. 前記リガンドがビオチニル化ヌクレオチドを含んで成る、請求項37に記載の装置。

40. 前記シグナル生成試薬が着色ラテックスビーズに結合したストレプトアビジンを含んで成る、請求項37に記載の装置。

41. 前記シグナル発生剤との接触後に前記シグナル生成試薬により生成されるシグナルがストレプトアビジン-アルカリホスファタ

28. 標的核酸配列の濃縮及び検出のための装置であって : 複数のウェルを規定する槽備品 ;

濡れているときに前記標的核酸配列の輸送を補助する、前記槽からの液輸送経路を規定する乾燥吸水性担体(ここでこの標的核酸配列はこの吸水性担体内で、キャピラリー作用により、この乾燥吸水性担体の接触部分がこの標的核酸配列を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される) ;

ハイブリダイゼーションによって前記標的核酸配列を捕獲するための核酸プローブ配列を含む少なくとも一核酸捕獲試薬(ここで、この少なくとも一核酸捕獲試薬はこの吸水性担体の接触部分の下流にあるこの乾燥吸水性担体上の捕獲ゾーンにおいて固定化されている) ; 及び

前記の捕獲された標的核酸配列を検出するための手段 ;

を含んで成る装置。

29. 検出のための前記手段が :

シグナル生成試薬に結合するリガンドを抱える、核酸配列を含む標的分子がその上に固定化されている吸水性担体 ; 及び

この核酸配列を含む標的分子の検出を指標する検出可能シグナルを生成するために、前記リガンドを抱える核酸配列を含む標的分子を前記シグナル生成試薬と接触させるための手段 ;

を含んで成る、請求項26に記載の装置。

30. 前記標的核酸配列が酵素増幅反応の生成物であり、そして少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマーを一体化せしめている、請求項29に記載の装置。

31. 前記非標的オリゴヌクレオチドが、前記標的核酸配列に一体化されていないオリゴヌクレオチドプライマーを含んで成る、請求項26に記載の装置。

ーゼコンジュゲートを含む、請求項38に記載の装置。

42. 前記した第一領域ウェルがシグナル生成試薬も含む、請求項26に記載の装置。

43. 前記複数のウェルが、洗浄溶液を含む第二領域ウェルを更に含む、請求項26に記載の装置。

44. 前記複数のウェルが、シグナル発生剤溶液を含む第三領域ウェルも含む、請求項26に記載の装置。

45. 前記複数のウェルが、標的核酸配列について検査すべきサンプルを含む第一領域ウェルを含んで成る、請求項28に記載の装置。

46. 前記複数のウェルが、シグナル生成試薬を含む第二領域ウェルを更に含んで成る、請求項28に記載の装置。

47. 前記複数のウェルが、洗浄溶液を含む第三領域ウェルを更に含んで成る、請求項28に記載の装置。

48. 前記複数のウェルが、シグナル発生剤を含む第四領域ウェルを更に含んで成る、請求項28に記載の装置。

49. 前記乾燥吸水性担体が少なくとも一本のストリップを含んで成る、請求項26に記載の装置。

50. 前記第一領域ウェルのそれぞれが、前記標的分子をそれらが捕獲される前記少なくとも一捕獲ゾーンに至るまで輸送するために、各ストリップの接触部分を受け入れるようになっている、請求項49に記載の装置。

51. 前記第二領域ウェルそれぞれが、前記ストリップ一捕獲ゾーンにおける前記標的分子の固定化の後の非特異的に捕獲された化合物の除去のために、前記ストリップを洗浄するために各ストリップの接触部分を受容するようになっている、請求項43に記載の装置。

52. 前記第三領域ウェルのそれぞれが、ストリップ全体を受容するようになっている、請求項44に記載の装置。

53. 接触のための前記手段が：

シグナル生成試薬溶液を含む少なくとも一第三領域ウェル；

前記少なくとも一捕獲ゾーンにおける前記標的分子の固定化を経た少なくとも一ストリップ（ここでこのストリップ全体がシグナル発生剤溶液と、このシグナル発生剤とこの少なくとも一捕獲ゾーンとの接触を可能とするように接触している）；

を含んで成る請求項52に記載の装置。

54. 前記第一領域ウェルそれぞれが、前記核酸配列を、それらが捕獲される少なくとも一捕獲ゾーンに至るまで輸送するよう各ストリップの接触部分を受容するようになっている、請求項28に記載の装置。

55. 前記第三領域ウェルそれぞれが、前記シグナル生成試薬を、それが前記標的核酸配列に抱えられたリガンドに結合する前記少なくとも一捕獲ゾーンに至るまで輸送するよう、各ストリップの接触部分を受容するようになっている、請求項46に記載の装置。

56. 前記第三領域ウェルそれぞれが、前記ストリップ一捕獲ゾーンにおける前記標的核酸配列の固定化の後の非特異的に捕獲された化合物の除去のために、前記ストリップを洗浄するために各ストリップの接触部分を受容するようになっている、請求項47に記載の装置。

57. 接触のための前記手段が：

シグナル生成試薬溶液を含む少なくとも一第四領域ウェル；

前記少なくとも一捕獲ゾーンにおける前記標的核酸配列の固定化を経た少なくとも一ストリップ（ここでこのストリップ全体がシグナル発生剤溶液と、このシグナル発生剤とこの少なくとも一捕獲ゾーンとの接触を可能とするように接触している）；

を含んで成る請求項48に記載の装置。

接触させて検出可能シグナルを生成することによって検出する；

段階を含んで成る方法。

60. 特異的な核酸配列の検出のための方法であって：

オリジナルの核酸配列の少なくとも一部に特異的である核酸配列を生成するために、このオリジナル核酸配列の少なくとも一部を酵素反応によって増幅し；

この標的核酸配列を含む液体サンプルを用意し；

この標的核酸配列をキャピラリー作用によって輸送し；

この標的核酸配列に濃縮し（ここで、この濃縮は：

乾燥吸水性担体を用意し（ここで、この標的核酸配列はこの吸水性担体内で、キャピラリー作用により、この乾燥吸水性担体の一部がこの標的核酸配列を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）；

この乾燥吸水性担体の一部を、この標的核酸配列を含む液体サンプルと接触させ（ここで、この乾燥吸水性担体は、濡れているとき、この標的核酸配列の輸送を補助する液輸送経路を規定する）；

この標的核酸配列をこの液輸送経路伝いに輸送し；そして

この標的核酸配列を、この液体サンプルと接触している吸水性担体の部分の下流にあるこの乾燥吸水性担体上の捕獲ゾーンにおいて固定化されている少なくとも一捕獲試薬により捕獲する；段階を含む）；次いで

この標的核酸配列を、シグナル生成試薬を含み、且つ吸水性担体上に固定化されているリガンドを有する標的核酸配列を、シグナル発生剤と接触させて検出可能シグナルを生成することによって検出する；

段階を含んで成る方法。

58. 前記第四領域ウェルがストリップ全体を受容するようになっている、請求項57に記載の装置。

59. 特異的な核酸配列の検出のための方法であって：

オリジナルの核酸配列の少なくとも一部に特異的である核酸配列を含む標的分子を生成するために、このオリジナル核酸配列の少なくとも一部を酵素反応によって増幅し；

この標的分子を、非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドから分離し（ここで、この分離は：

非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドに結合する基体を含む槽を用意し；

前記標的分子と、非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドを含む液体サンプルを加え；そして

この標的分子をキャピラリー作用によって輸送する；段階を含む）；

この標的分子に濃縮し（ここで、この濃縮は：

乾燥吸水性担体を用意する（ここで、この標的分子はこの吸水性担体内で、キャピラリー作用により、この乾燥吸水性担体の一部がこの標的分子を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）；

この乾燥吸水性担体の一部を、この標的核酸配列を含む液体サンプルと接触させる（ここで、この乾燥吸水性担体は、濡れているとき、この標的分子の輸送を補助する液輸送経路を規定する）；

この標的分子をこの液輸送経路伝いに輸送し；そして

この標的分子を、この液体サンプルと接触している吸水性担体の部分の下流にあるこの乾燥吸水性担体上の捕獲ゾーンにおいて固定化されている少なくとも一捕獲試薬により捕獲する；段階を含む）；次いで

この標的分子を、シグナル生成試薬を含み、且つ吸水性担体上に固定化されているリガンドを有する標的分子を、シグナル発生剤と

明 細 書

核酸配列の検出のための方法及び装置

発明の分野

本発明はオリゴヌクレオチド及びヌクレオチドからの標的核酸配列を含む標的分子の分離、並びにこの分子の濃縮及び検出のための装置及び方法に関する。

発明の背景

標的核酸配列を含む標的分子の検出のための手順における増幅手順の利用は当業界に公知である。典型的には、この手順は標的核酸配列の酵素的増幅、及びゲル電気泳動、それに続くサザンブロット手順による標的分子の検出が含まれる。

数多くの固相捕獲アッセイも、核酸配列を含む標的分子の検出のための手順を簡素化するために開発されている。これらの手順においては、2種類のリガンドが一般に増幅標的核酸配列の中に一体化される。第一リガンドは、固相マトリックス上に、増幅標的核酸配列を含む標的分子を捕獲するために使用され、そして第二リガンドは、この第二リガンドへのシグナル生成試薬の結合によって標的分子を検出するために使用されている。

ところで、固相アフィニティ捕獲アッセイは反応混合物中の高比率の標的分子を捕獲するのに長い反応時間を必要とする（Sauvaigoら、Nucleic Acid Research, 1990, 第18巻, 頁3175-3182）。更に、捕獲が、固相アフィニティリガンドを含む増幅プライマーにより仲介されるとき、このアッセイの感度は自由プライマーと標的核酸配列の中に一体化されたプライマーとの競合によって悪くなる

ことがある。

選別及び濃縮手順としてのクロマトグラフィーの利用は当業界に公知である。DNA 分子は濡れた紙の上ではクロマトグラフィー的に移動するが、乾いた紙に溶液が付与されたときはそれらは泳動しないことが報告されている (Bendich ら、Arch Biochem. Biophys., 1961, 94, 417-423)。

発明の概要

本発明の第一の目的は、核酸配列を含む分子のキャピラリー（毛細管）輸送のための方法及び装置の提供にある。

本発明の別の目的は、液体サンプル中の標的核酸配列を含む標的分子の濃縮のための方法及び装置の提供にある。

本発明の更なる目的は、ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドからの、標的核酸配列を含む標的分子の分離のための方法及び装置の提供にある。

本発明の別の目的は、特異的な核酸配列を含む標的分子の検出のための方法の提供にある。

本発明に従い、吸水性担体中で核酸配列を含む分子を輸送するための装置が提供され、この担体は該分子を含む溶液と接触しているときに該分子の輸送を補助するキャピラリー輸送経路を規定する乾燥吸水性担体を含んで成る。

本発明の好ましい態様に従い、液体サンプル中の標的分子の濃縮のための装置が提供され、これは乾燥吸水性担体を含み、ここでその標的分子には標的核酸配列が含まれ、そしてそれはこの吸水性担体内で、キャピラリー作用により、この乾燥吸水性担体の一部がこの標的分子を含む液体サンプルと接触しているときに輸送され、そして少なくとも一捕獲試薬が、この吸水性担体の接触部分の下流に

ある乾燥吸水性担体上の少なくとも一捕獲ゾーンにおいて固定化されており、ここでこの少なくとも一捕獲試薬はこの標的分子を捕獲することが可能である。

また、本発明に従い、標的分子、と非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドとを含む液体サンプル中の非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドから、標的核酸配列を含む標的分子の分離のための装置を提供し、これは、この非標的オリゴヌクレオチドに結合する化合物を含む槽と、キャピラリー作用によってこの槽から標的分子を輸送するための器具とを含んで成る。

本発明の好ましい態様に従うと、この乾燥吸水性担体はニトロセルロース膜であり、ここでその吸収部位は標的分子のキャピラリー輸送を助長するためにブロックされている。

本発明の別の好ましい態様に従うと、この乾燥吸水性担体は硬質枠によって支持されている。

本発明の更に別の好ましい態様に従うと、この乾燥吸水性担体伝いの液体のキャピラリー輸送を助長するために、この吸水担体に、その少なくとも一捕獲ゾーンの下流に、吸収パッドが固定されている。

本発明の更なる別の好ましい態様に従うと、このニトロセルロース膜の吸収部位は巨大分子、清浄剤及びそれらの組合せより成る群から選ばれる化合物によってブロックされている。

本発明の更なる別の好ましい態様に従うと、その巨大分子にはタンパク質が含まれる。

本発明の更なる好ましい態様に従うと、この少なくとも一捕獲試薬にはこの標的核酸配列の改質領域に対する抗体が含まれる。

本発明の別の好ましい態様に従うと、この少なくとも一捕獲試薬は、この標的核酸配列の少なくとも一部に相補的な核酸プローブ配

列を含む少なくとも一核酸捕獲試薬を含んでいる。

本発明の更なる別の好ましい態様に従うと、この核酸プローブ配列はDNA 配列を含む。

本発明の更なる別の好ましい態様に従うと、この核酸プローブ配列はRNA 配列を含む。

本発明の更なる好ましい態様に従うと、この標的分子は30以上の塩基対を含んで成る標的核酸配列を含む。

本発明の別の好ましい態様に従うと、この標的分子は、酵素増幅反応の核酸生成物を含み、そして少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマーを含む核酸配列を一体化せしめる。

本発明の更なる別の好ましい態様に従うと、この少なくとも一対のプライマーはポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) のためのプライマーを含む。

本発明の更なる好ましい態様に従うと、この少なくとも一対のプライマーはリガーゼ連鎖反応 (LCR) のためのプライマーを含む。

本発明の更なる好ましい態様に従うと、この少なくとも一対のプライマーのうちの少なくとも第二プライマーは前記の少なくとも一捕獲試薬に結合するリガンドを抱えるオリゴヌクレオチドを含んでおり、これにより、このリガンドを抱える少なくとも一プライマーを含む標的分子はこの少なくとも一捕獲試薬に結合しうる。

本発明の更なる好ましい態様に従うと、このリガンドは抗原性エпитープを含む少なくとも一捕獲試薬に結合する。

本発明の別の好ましい態様に従うと、少なくとも一捕獲試薬に結合するリガンドは少なくとも一スルホン化シトシンを含む。

本発明の更なる別の好ましい態様に従うと、この化合物はこの器具による輸送にとっては大きすぎるゲル濾過粒子を輸送のために含む。

本発明の更なる別の好ましい態様において、この非標的オリゴヌクレオチドは標的核酸配列に一体化していないオリゴヌクレオチドプライマーを含む。

本発明の更なる好ましい態様において、この化合物は輸送手段によって輸送されることのないマトリックスを含み、ここでその化合物は非標的オリゴヌクレオチドとハイブリダイズする。

本発明に従い、吸水性担体内で核酸配列を含む分子を輸送するための方法が提供され、これは、核酸配列を含む分子の輸送を補助するキャピラリー輸送経路を規定する乾燥吸水性担体を用意し、そしてこの乾燥吸水性担体を、核酸配列を含む分子を含んでいる溶液と接触させる段階を含む。

更に、本発明に従うと、液体サンプル中の、核酸配列を含む分子の濃縮のための方法が提供され、これは、乾燥吸水性担体を用意し（ここで、その分子は標的核酸配列を含む標的分子であり、そしてここでその分子は、この乾燥吸水性担体の一部をこの分子と含む液体サンプルと接触させたときに、キャピラリー作用によってこの吸水性担体内で輸送される）、この乾燥吸水性担体の一部を、標的分子を含む液体サンプルと接触させ（ここでこの乾燥吸水性担体は濡れているときに、核酸配列を含む分子の輸送を補助する液輸送経路を規定する）、その液輸送経路伝いにこの標的分子を輸送させ、そしてこの液体サンプルと接触している吸水性担体の部分の下流にあるこの乾燥吸水性担体上の少なくとも一捕獲ゾーンにおいて固定化されている少なくとも一捕獲試薬によってこの標的分子を捕獲する、段階を含む。

本発明に従い、標的分子と、非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドとを含む液体サンプル中の非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドから、標的核酸配列を含む標的分子の分離のための方

法が提供され、これは、この非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド配列に結合する化合物を含む槽を用意し、この標的分子と、非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドとを含む液体サンプルを加え、そしてこの標的分子をキャピラリー作用によって輸送する段階を含む。

本発明に従うと、標的分子と、非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドとを含む液体サンプル中のこの非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドからの、標的核酸配列を含む標的分子の分離、この標的分子の濃縮、並びにこの濃縮標的分子の検出のための装置も提供され、これは、この非標的オリゴヌクレオチドに結合する化合物を含む第1領域の複数のウェルを含む複数のウェルを規定する槽備品（ここで、この液体サンプルはこの第一領域の複数のウェルに加えられる）、濡れているときに標的分子の輸送を補助する、この槽からの液輸送経路を規定する乾燥吸水性担体（ここで、この標的分子は、この中吸水性担体中で、キャピラリー作用により、この乾燥吸水性担体の一部が標的分子を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）、この標的分子を捕獲することのできる少なくとも一捕獲試薬（ここで、この少なくとも一捕獲試薬は、この吸水性担体の接触部分の下流にあるこの乾燥吸水性担体上の少なくとも一捕獲ゾーンにおいて固定化されている）、及びこの捕獲標的分子を検出するための装置、を含む。

更に、本発明に従うと、液体サンプル中の、標的核酸配列の濃縮及び検出のための方法が更に提供され、これは、乾燥吸水性担体を用意し（ここで、この標的核酸配列は、この乾燥吸水性担体の一部をこの標的核酸配列を含む液体サンプルと接触させたときに、キャピラリー作用によってこの吸水性担体内で輸送される）、この乾燥吸水性担体の一部を、標的核酸配列を含む液体サンプルと接触させ

（ここでこの乾燥吸水性担体は濡れているときに、標的核酸配列の輸送を補助する液輸送経路を規定する）、その液輸送経路伝いにこの標的核酸配列を輸送させ、そしてこの液体サンプルと接触している吸水性担体の部分の下流にあるこの乾燥吸水性担体上の少なくとも一捕獲ゾーンにおいて固定化されている少なくとも一核酸捕獲試薬とのハイブリダイゼーションによってこの標的核酸配列を捕獲する、段階を含む。

本発明に従い、標的核酸配列の濃縮及び検出のための装置が更に提供され、これは、複数のウェルを規定する槽備品、濡れているとき標的分子の輸送を補助する、この槽からの液輸送経路を規定する乾燥吸水性担体（ここで、この標的核酸配列は、この吸水性担体内で、キャピラリー作用により、この乾燥吸水性担体の一部がこの標的核酸配列を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）、ハイブリダイゼーションによってこの標的核酸配列を捕獲するための核酸プローブ配列を含む少なくとも一核酸捕獲試薬（ここでこの少なくとも一核酸捕獲試薬は、この吸水性担体の接触部分の下流にあるこの乾燥吸水性担体上の少なくとも一捕獲ゾーンにおいて固定化されている）、及びこの捕獲標的核酸配列を検出するための装置、を含む。

本発明の好ましい態様に従うと、検出のための装置は、シグナル生成試薬に結合するリガンドを抱える標的分子が固定化されている吸水性担体、及びこのリガンドを抱える標的分子をこの標的分子の検出を指標する高感度シグナルを生成するシグナル生成試薬と接触させるための装置を含む。

本発明の更に好ましい態様に従うと、検出のための装置は、シグナル生成試薬に結合するリガンドを抱える標的分子が固定化されている吸水性担体、及びこのリガンドを抱える標的分子を、この標的

分子の検出を指標する高感度シグナルを生成する発色剤と反応するシグナル生成試薬と接触させるための装置を含む。

本発明の別の好ましい態様に従うと、この標的核酸配列は酵素増幅反応の生成物を含み、そして少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマーを含む。

本発明の更なる別の好ましい態様に従うと、この非標的オリゴヌクレオチドは、この標的核酸配列に一体化されていないオリゴヌクレオチドプライマーを含む。

本発明の更なる別の好ましい態様に従うと、その少なくとも2組のプライマーがポリメラーゼ連鎖反応（PCR）のためのプライマーを含む。

本発明の更なる好ましい態様に従うと、少なくとも一対のプライマーはリガーゼ連鎖反応（LCR）のためのプライマーを含む。

本発明の更なる好ましい態様に従うと、この少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマーのうちの少なくとも第二プライマーは少なくとも一捕獲試薬に結合するリガンドを含んでおり、これにより、このリガンドを含む標的分子はこの少なくとも一捕獲試薬に結合しうる。

本発明の別の好ましい態様に従うと、この少なくとも一捕獲試薬に結合するリガンドは少なくとも一スルホン化シトシンを含む。

本発明の更なる別の好ましい態様に従うと、この少なくとも一対のプライマーのうちの第一プライマーは、シグナル生成試薬に結合するリガンドを含み、これによりこのリガンドを含む標的分子は、シグナル生成試薬により生成されるシグナルの存在によって検出される。

本発明の更なる好ましい態様に従うと、この少なくとも一対のプライマーのうちの第一プライマーは、シグナル生成試薬に結合する

リガンドを含み、これによりこのリガンドを含む標的分子は、シグナル発生剤と接触した後にこのシグナル生成試薬により生成されるシグナルの存在により検出される。

本発明の更なる別の好ましい態様に従うと、このシグナル生成試薬に結合するリガンドをビオチニル化ヌクレオチド配列を含む。本発明の更なる好ましい態様に従うと、このシグナル生成試薬は着色ラテックスビーズに結合したストレプトアビジンを含む。

本発明の別の好ましい態様に従うと、シグナル発生剤との接触後にこのシグナル生成試薬により生成されたシグナルはストレプトアビジン-アルカリホスホファクター-ゼコンジュゲートを含む。

本発明の別の好ましい態様に従うと、この第一領域のウェルはシグナル生成試薬も含む。

本発明の更なる好ましい態様に従うと、複数のウェルは更に、洗浄溶液を含む第二領域のウェルを含む。

本発明の更なる別の好ましい態様に従うと、複数のウェルはシグナル発生剤溶液を含む第三領域のウェルを含む。

本発明の別の好ましい態様に従うと、この乾燥吸水性担体は少なくとも一本のストリップを含む。

本発明の更なる好ましい態様に従うと、複数のウェルは標的核酸配列について検査すべきサンプルを含む第一領域のウェルを含む。

本発明の別の好ましい態様に従うと、複数のウェルは更にシグナル生成試薬を含む第二領域のウェルを含む。

本発明の別の更なる好ましい態様に従うと、複数のウェルは更に洗浄溶液の第三領域のウェルを含む。

本発明の更なる別の好ましい態様に従うと、複数のウェルはシグナル発生剤を含む第四領域のウェルを含む。

本発明の更なる好ましい態様に従うと、第一領域のウェルのそれ

ぞれは、標的分子が、それらが捕獲される少なくとも一捕獲ゾーンに至るまで輸送されるよう、各ストリップの接触部分を受容するようになっている。

本発明の更に好ましい態様に従うと、この第二領域のウェルそれぞれは、前記少なくとも一捕獲ゾーンにおける標的分子の固定化後の非特異的捕獲化合物を除去するのに前記ストリップを洗浄するため、各ストリップの接触部分を受容するようになっている。

本発明の更なる好ましい態様に従うと、この第三領域のウェルはストリップ全体を受容するようになっている。

本発明の別の好ましい態様に従うと、前記接触のための装置は、シグナル生成試薬溶液を含む少なくとも一第三領域のウェル、及び前記少なくとも一捕獲ゾーンにおける標的核酸の固定化を経た少なくとも一ストリップを含み、ここでこのストリップ全体は、シグナル発生剤と少なくとも一捕獲ゾーンとの接触を可能とするようにシグナル発生剤溶液と接触している。

本発明の更なる別の好ましい態様に従うと、前記第一領域のウェルそれぞれは、標的核酸配列が、それらが捕獲される少なくとも一捕獲ゾーンに至るまで輸送されるように、各ストリップの接触部分を受容するようになっている。

本発明の更なる別の好ましい態様に従うと、前記第二領域のウェルそれぞれは、シグナル生成試薬が、それらが標的核酸配列上に抱えられたリガンドに結合する箇所である少なくとも一捕獲ゾーンに至るまで輸送されるように、各ストリップの接触部分を受容するようになっている。

本発明の更なる好ましい態様に従うと、前記第三領域のウェルそれぞれは、少なくとも一捕獲ゾーンにおける標的核酸配列の固定化後に非特異的捕獲化合物を除去するのにこのストリップを洗浄する

ため、各ストリップの接触部分を受容するようになっている。

本発明の更なる好ましい態様に従うと、前記接触のための装置は、シグナル発生剤を含む少なくとも一第四領域のウェル、及び前記少なくとも一捕獲ゾーンにおける標的核酸配列の固定化を経た少なくとも一ストリップを含み、ここでこのストリップ全体は、シグナル発生剤と少なくとも一捕獲ゾーンとの接触を可能とするようにシグナル発生剤溶液と接触している。

本発明の更なる好ましい態様に従うと、この第四領域のウェルそれぞれはストリップ全体を受容するようになっている。

本発明に従い、特異的な核酸配列の検出のための方法も提供され、この方法は、オリジナルの核酸配列の少なくとも一部に特異的である核酸配列を含む標的分子を生成するために、このオリジナルの核酸配列の少なくとも一部を酵素反応により増幅させ、この標的分子を非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドから分離し（この分離は、この非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドに結合する基体を含む槽を用意し、標的分子と、この非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドとを含む液体サンプルを加え、次いでキャピラリー作用によってこの標的分子を輸送する段階を含む）、この標的分子を濃縮し（この濃縮は、乾燥吸水性担体を用意し（ここで、標的分子は、この吸水性担体内で、キャピラリー作用により、この乾燥吸水性担体の一部が標的分子を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）、この乾燥吸水性担体の一部を、標的核酸配列を含む液体サンプルと接触させ（ここでこの乾燥吸水性担体は、濡れているとき、この標的分子の輸送を補助する液輸送経路を規定する）、この標的分子をこの液輸送経路伝いに輸送し、次いでこの標的分子を、液体サンプルと接触している吸水性担体の部の下流にある乾燥吸水性担体上の少なくとも一捕獲ゾーンにおいて固定化され

ている少なくとも一捕獲試薬によって捕獲する段階を含む）、次いで、シグナル生成試薬と結合するものであって吸水性担体上に固定化されているリガンドを有する標的分子を、シグナル生成試薬と接触させて検出可能なシグナルを生成することによりこの標的分子を検出する、段階を含む。

本発明に従って特異的な核酸配列の検出のための方法が更に提供され、この方法は、オリジナルの核酸配列の少なくとも一部に特異的である標的核酸配列を生成するためにオリジナルの核酸配列の少なくとも一部を酵素反応により増幅させ、この標的核酸配列を含む液体サンプルを用意し、この標的核酸配列をキャピラリー作用により輸送し、この標的核酸配列を濃縮し（この濃縮は、乾燥吸水性担体を用意し（ここで、この標的核酸配列はこの吸水性担体内で、キャピラリー作用によって、この乾燥吸水性担体の一部がこの標的核酸配列を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）、この乾燥吸水性担体の一部をこの標的核酸配列を含む液体サンプルと接触させ（ここで、この乾燥吸水性担体は、濡れているとき、この標的核酸配列の輸送を補助する液輸送経路を規定する）、次いでこの標的核酸配列をこの液輸送経路伝いに輸送する段階を含む）、この標的核酸配列を、液体サンプルと接触している吸水性担体の部分の下流にあるこの乾燥吸水性担体上の少なくとも一捕獲ゾーンにおいて固定化されている少なくとも一核酸捕獲試薬によって捕獲し、次いでこの標的核酸配列を、シグナル生成試薬に結合するものであって吸水性担体上に固定化されているリガンドを有する標的核酸配列をシグナル発生剤と接触させて検出可能なシグナルを生成することによって検出する段階を含んで成る。

図面の簡単な説明

本発明は図面と関連付けた下記の詳細な説明からより完全に理解及び知得されるものであり、ここで：

図1は、液体サンプル中の非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドからの標的核酸配列の分離、標的核酸配列の濃縮、並びに濃縮標的核酸配列の検出のための、本発明に従って構築され、且つ使用される、使用前の装置の前面図であり；

図2は、使用中の図1の装置の前面図であり；

図3は、使用前の図1の装置とは別の態様の前面図であり；そして

図4は、使用中の図3の装置の前面図である。

好ましい態様の詳細な説明

図1～4について参照されたいが、これは本発明の好ましい態様に従って構築され、且つ使用される、液体サンプル中の非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドからの標的核酸配列を含む標的分子の分離、標的分子の濃縮、並びに濃縮標的分子の検出のための装置10を示している。

装置10は、非孔性材料、例えばポリスチレンより組立てられ、且つ複数のウェル、例えばウェル14、16及び18を含む槽12を含む。これらのウェル、例えばウェル14、16及び18はおおよそ、長さ1 cm、幅0.5 cm、そして深さ2.5 cmであり、そしてストリップ20の接触部分20を受容するようなサイズである。

このストリップ22は、ほぼ長さ3.0 cm及び幅0.5 cmであり、且つ3～5ミクロンの孔径を有するマイレッド(mylered)ニトロセルロース膜において典型的に具現化された吸水性担体24を含み、これは補強枠26によって囲まれていてよい。この補強枠26は非孔性材料、

例えばポリスチレンより超立てられ、そして吸水性担体24はこの枠22に接着剤のような常用の手段によって装着されてよい。ほぼ長さ2 cm、幅0.5 cmの、吸収材料、例えばWhatman 3MM ペーパー(Whatman, Maidstone, U. Kより入手可)より成る吸収パッド27が、接着剤のような常用の手段によって接触部分20と対立するこのストリップの先端に取付けられている。このストリップ22の先端には、接着剤のような常用の手段によってとっ手28も取付けられている。このとっ手28は非孔性材料、例えばポリスチレンより成る。少なくともストリップ22がとっ手28に取付けられて、検査部材30を構成している。

単独の捕獲試薬が一般に、吸水性担体24の上にその吸水性担体の中心領域において固定化されて、捕獲ゾーン32を形成している。単独の捕獲試薬が一般に利用されるが、単独の吸水性担体上に多重捕獲ゾーンを形成するように複数の捕獲試薬が利用されてよい。

単独捕獲試薬、典型的には抗スルホン化DNA 抗体、又は標的核酸配列の少なくとも一部に相補性である核酸は、ニトロセルロース脱上への吸収によって典型的に固定化されている。

ウェル14は典型的には酵素反応混合物を含む。更に、この捕獲試薬が抗スルホン化DNA 抗体のとき、ウェル14は典型的にはゲル濾過粒子(図示せず)、典型的にはSephadex G-100 (Pharmacia, Uppsala, Sweden)ゲル濾過粒子を含む。このゲル濾過粒子は吸水性担体24の中でキャピラリー作用によって輸送されるには大きすぎるサイズである。

装置10を利用して特異的な核酸配列を検出するために利用する手順は典型的には、少なくとも一対のプライマーを利用するポリメラーゼ連鎖反応(PCR)又はリガーゼ連鎖反応(LCR)を利用した特異的核酸配列の酵素増幅を含む。これらの反応の少なくとも一対のプ

ライマーのうちの少なくとも第一プライマーは、アフィニティーリガンド、典型的にはシグナル生成試薬に結合するビオチン、典型的にはストレプトアビジンアルカリホスファターゼコンジュゲートを抱える。更に、捕獲試薬が抗スルホン化DNA 抗体であるとき、酵素増幅のための少なくとも一対のプライマーのうちの少なくとも第一プライマーは、アフィニティーリガンド、典型的にはスルホン化シトシンを抱えており、これは捕獲ゾーン22の捕獲試薬に結合している。数回の増幅サイクル、典型的には1〜50サイクルを経て、反応混合物のアリコート装置10を利用してアッセイする。

捕獲試薬が抗スルホン化DNA 抗体であるとき、標的核酸配列、オリゴヌクレオチドプライマー及びヌクレオチドを含む反応混合物のアリコート、典型的には1〜20 μ lをウェル14に加える。シグナル生成試薬を含む溶液、典型的にはTPG ランニングバッファー(0.3%のツイーン20及び1%のゼラチン; PBS 中)中のストレプトアビジンアルカリホスファターゼコンジュゲート約30 μ lもウェル14に加え、次いでストリップ22の接触部分20を反応混合物と接触させてウェル14の中に入れた。核酸配列を含む標的分子を含んでいるこの反応混合物をキャピラリー輸送によって吸水性担体24内に、捕獲ゾーン32を経て(ここで標的分子は捕獲試薬により捕獲される)吸収パッド27へと搬送させる。

約10分後、ラベル化核酸配列を含む分子のほとんど(典型的にはラベル化分子のうちの80%以上)が捕獲ゾーンの中に捕獲された。次にストリップ22の接触部分20をウェル14から除去し、そしてウェル16の中に入れた。

ウェル16は典型的には約50 μ lのTPバッファー(PBS 中の0.3%のツイーン)を含み、これは吸水性担体24内に捕獲ゾーンへと搬送され、標的核酸配列の検出を妨害しうる非特異的捕獲化合物を除

去する。約10分後、ストリップ22をウェル16から取出し、そしてウェル18に浸した。

ウェル18は約300 μ lのシグナル発生剤溶液、典型的には発色基質(BCIP/NBT, Orgenics Ltd., Yavne Israel より市販)を含むChemiprobe(商標)溶液を含む。この溶液が捕獲ゾーン32を覆っている。シグナル生成試薬、即ちこの捕獲ゾーン32中のラベル化分子に付加しているアルカリホスファターゼは、この発色基質を、標的核酸配列の検出を指標する検出可能シグナルである沈殿性色素へと変換せしめる。

捕獲試薬が、標的核酸配列の少なくとも一部に相補的な核酸であるとき、この反応混合物のアリコートを典型的には0.6 MのNaCl, 20mMのリン酸バッファー、pH 7.5, 0.02%のフィコール400 (Sigma, St. Louis, MO, USA), 0.02%のゼラチン及び1% PVP より成るハイブリダイゼーション溶液で希釈する。次にこのサンプルを典型的には煮沸し、次いで急冷し、そして各溶液のアリコートを装置12のウェル14に移す。各ストリップ22の接触部分20を次にウェル14中の溶液と典型的には接触させる。

次に装置10を典型的には多湿インキュベーターの中に約25分入れておき、そして吸水性担体24を形成しているニトロセルロースストリップ伝いにこの溶液を泳動させる。核酸配列を含む標的分子を含む溶液を吸水性担体24伝いに、キャピラリー輸送によって、吸収パッド27へと搬送し、そして捕獲ゾーン32を通過させ、ここで標的分子はこの標的核酸配列に相補性の核酸によって捕獲される。

ストリップ22を次に典型的にはストレプトアビジンアルカリホスファターゼコンジュゲートを含むウェル16に移す。次にストリップ22を典型的にはPBS 中の0.3%のツイーン20 150 μ lを含む溶液を含んでいるウェル18に移し、そしてストリップ22の接触部分20をこ

の溶液に約15分接触させておいた。

最後に、ストリップ22を図面には示していない一連のウェルの中の、発色反応のための基質を供する。ChemiPrope(商標) BCIP/NBT 溶液の中に約20分浸した。ストリップ22の捕獲ゾーン32における青色シグナルは標的分子の存在を示唆している。

図3及び4においてわかる通り、一より多くのストリップ22をとっ手28に取付けて、複数のアッセイを同時に行うを可能とすることができる。

実施例を、本発明を例示する図1〜4と共に下記に説明する。

実施例1

ニトロセルロース上での輸送及び濃縮

a) プライマーの配列合成及びラベリング

HIV-1の遺伝子におけるプライマーを選び、そして下記の配列を有していた:

プライマー 3

5' TGGGAAGTTCAATTAGGAATACAC

プライマー 3' 5' TGGGAAGTTCAATTAGGAATA

プライマー 4

5' CCTACATACAAATCATCCATGTATTC

これらのプライマーをApplied Biosystems 380A DNA シンセサイザー(Applied Biosystems, Hayward, CA, USA)で合成し、そしてOPC 迅速精製カートリッジ(Applied Biosystems, CA, USA)を用いて精製した。

プライマーのスルホン化

プライマー3'を5'末端において、13量体ポリシトシンテールによって合成した。これらのプライマーを次にChemiProbe(商標)キット(Orgenics Ltd. より市販)に記載のプロトコールに従って

スルホン化した。

100 μ l の C テールプライマー (0.5 mg/ml) を ChemiProbe (商標) キットの溶液 A (4 M の亜硫酸水素ナトリウム) 50 μ l 及び ChemiProbe (商標) キットの溶液 B (1 M) のメトキシアミン) 12.5 μ l と混ぜ、そして 20°C で一夜インキュベートした。次にスルホン化オリゴヌクレオチドを 2 μ l のベッドの Sephadex G-50 スピナラムを通じる遠心により脱塩した。

プライマービオチニル化

プライマー 4 を 5' 末端において、4 個のシトシンヌクレオチドが N⁴-LCA-5-メチルデオキシシチジン (American Bionetics, Hayward, CA, USA) により置き代って CccCccCccCcc (ここで C は改質シトシンを表わす) となっている 12 量体ポリシトシンによって合成した。これらのオリゴヌクレオチドを、その教示内容を引用することによって本明細書に組入れる Maniatis, T. ら、Molecular cloning : a laboratory manual, 1989, p646, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. に記載の手順に従ってアクリルアミドゲルにより精製した。

精製したオリゴヌクレオチドを下記の手順に従ってビオチニル化した：

10 nmole のデシケートに付したプライマーを 50 μ l の 100 mM のホウ酸バッファーの中に溶かし、そして 0.1 mg のビオチン N ヒドロキシスクシニミド (Pierce, Rockford, ILL, USA) 0.1 mg を含む 50 μ l のジメチルホルムアミド (DMF) に加えた。この溶液を次に 20°C で一夜インキュベートし、次いで Nensorb 20 カラム (Du Pont Company, Wilmington, DE, USA) を通じて、その供給者の仕様に従って精製した。このプライマーを次にエバポレーションにより濃縮し、そしてもとの温度となるように水に再懸濁した。

を構成する。リン酸緩衝食塩水 (PBS) 中の 1 % のスクロースの添加された、Orgenics Ltd. より市販の精製マウスモノクローナル抗-改質 DNA (カタログ no. 10793010) (2 mg/ml) 1 μ l を、ニトロセルロースストリップの中央に水平線において包埋して捕獲ゾーン 32 を形成した。このストリップを次に 37°C で 1 時間風乾した。

次に自由な吸収部位を、PBS 中の 1 % のゼラチン (Norland Products Inc., New Brunswick Canada) 及び 0.05 % のツイーン 20 (Sigma) の溶液の中に 2 時間このストリップをインキュベートすることによってブロックした。このニトロセルロースストリップを次に水の中で簡単に洗い、37°C のインキュベーターの中で 1 時間乾かし、そしてデシケートのもとで少なくとも 4 ヶ月間保管した。吸収パッド 27 として働くよう、0.5 \times 2 cm の四角い Whatman 3MM ペーパーをこのストリップの上面に取付けた。

2. ブロッキング工程抜きで上記の通りにマイレッド ニトロセルロース片を用意した。

d) DNA の輸送及び濃縮

PCR 反応混合物を TGP ランニングバッファー (PBS 中の 0.30 % のツイーン 20 及び 1 % のゼラチン) 又は PBS のいずれかに 10 倍に希釈した。次に 30 μ l ずつの各溶液を、図 1 ~ 4 に示す装置のウェルと似たウェルに移し、そして各ストリップ 22 の接触部分 20 をこの溶液と接触させた。

この溶液を、吸水性担体 24 を構成するニトロセルロースストリップ伝いに室温で 10 分泳動させた。次にこのストリップに、1 : 2,500 に希釈したストレプトアビジンアルカリホスファターゼコンジュゲート (Enzymatix, Cambridge, U. K.) の溶液を完全に覆った。室温で 10 分のインキュベーションの後、このストリップを水で簡単に洗い、次いで BCIP/NBT ChemiProbe (商標) 溶液 (Orgenics Ltd.) によ

b) HIV 配列の増幅 陽性 HIV サンプル由来の抽出 DNA 1 μ g を含む 100 μ l の混合物 (抽出手順は、その教示内容を引用することによって本明細書に組入れる Edwards ら、The Journal of Pediatrics, 1989, 第 45 巻, 頁 200-203 に従う)。100 pmole ずつのプライマー P3 及び P4, 0.25 mM の 4 種のデオキシヌクレオチド三リン酸 (dNTP)、10 μ l の 10X の Taq バッファー (Promega, Madison, Wisconsin, USA) 並びに 2.5 U の Taq ポリメラーゼ (Promega) を、プログラム可能 Grant (Cambridge, U. K.) 浴槽で下記条件のもとで増幅した。

94°C で 5 分の第一 DNA 変性段階に、94°C で 1 分の変性、52°C で 1 分の DNA アニールリング及び 72°C で 1 分の DNA 伸長の 30 サイクルを続けた。増幅は 72°C で 7 分間の伸長段階で終えた。

第二増幅は、第一増幅と同じ条件だが、前述のラベル化ビオチニル化及びスルホン化プライマーを利用して 20 サイクルにわたって行なった。使用した DNA 鋳型は、100 pmole ずつの各ラベル化プライマー、0.25 mM の 4 種のデオキシヌクレオチド三リン酸、10 μ l の 10X の Taq バッファー (Promega) 及び 2.5 U の Taq ポリメラーゼ (Promega) を含む 100 μ l の混合物の中に希釈した第一 PCR 混合物 1 μ l とした。プライマーを PCR 生成物から、反応混合物 100 μ l を 2.5 M の NaCl 溶液中のポリエチレングリコール (PEG) (Sigma, St. Louis MO, USA) 60 μ l と混合することにより排除した。この混合物を次に 4°C で 1 時間インキュベートした。次に、4°C で 10,000 xg で 10 分間の遠心の後、上清液を捨て、そしてそのペレットを 100 μ l の水に再懸濁した。

c) ニトロセルロース支持ストリップの製造

1. ミレッド ニトロセルロース (孔径 3 μ) (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) を 0.5 \times 3.0 cm の長に切り、図 1 ~ 4 の装置の吸水性担体 24 を行った。この吸水性担体 24 はストリップ 22

に覆った。5 分後、このストリップを水で簡単に洗い、そして目視に付した。色素はエタノールの中での簡単な洗浄及び室温での乾燥により安定にした。その捕獲ゾーンに紫の線分が認められたらストリップ 22 は HIV について陽性であると考えた。

バッファーとして PBS を用いてのニトロセルロースストリップ上の吸収部位をブロックしていないニトロセルロースストリップ上での PCR 増幅 HIV 生成物の泳動は陽性反応を示すことがなかった。しかしながら、ニトロセルロースの自由吸収部位がゼラチン溶液によってブロックされているストリップ 22 は、ランニングバッファーとして PBS を用いたときに可視シグナルを提供した。更に、PCR 反応混合物溶液との接触に付する前に吸収部位をブロックしていないストリップ 22 は、TGP ランニングバッファーを使用したときに可視シグナルを提供した。最も強いシグナルは、ブロックストリップ及び TGP ランニングバッファーの両方を使用したときに得られた。

これらの結果は、増幅核酸配列がキャピラリー移動により、ニトロセルロースの吸収部位が核酸配列のキャピラリー輸送の前又は最中のいずれかにおいてブロックされているニトロセルロースストリップ伝いに泳動できることを示唆している。更に、これらの結果は、溶液中の増幅 DNA が、ブロック化ニトロセルロースストリップを接触点において増幅 DNA を含む溶液と接触させ、次いでこの増幅 DNA をその接触点の下流にあるこのニトロセルロースストリップ上の適当な捕獲部位において捕獲することにより濃縮されうることとも示唆している。

実施例 2

ニトロセルロース上でのゲノム及びプラスミド DNA の輸送及び濃縮 ヒト胎盤 DNA (Sigma), CasKi 細胞 DNA 及びブルースクリプト プラスミド DNA を用意し、そして Nur ら (Ann. Biol. Clin. 1989,

47, 601-606)に記載の通りにスルホン化し、ここでCasKi 細胞DNA又はヒト胎盤DNAの各分子は約 10^{14} 塩基対を有している。HIV 特異的PCR 生成物を増幅し、ここで一方のプライマーはスルホン化し、他方のプライマーはビオチニル化し、これによって実施例1に記載の通りPCR 生成物を二重ラベルに付した。ブロック吸収部位を有するニトロセルロースストリップ22も実施例1に記載の通りに用意した。

3種類のDNAのそれぞれの $20\mu\text{g}/\text{ml}$ の溶液(スルホン化又は未スルホン化) $1\mu\text{l}$ を $20\mu\text{l}$ のTGP ランニングバッファーに加えた。このDNA 溶液をウェルに入れ、そしてこのストリップ22の接触部分をこの溶液と接触させた。10分後、このストリップをDNA 溶液から取出し、そして別のウェルに移し、ここでそのストリップ22の接触部分20を、二重ラベルPCR 生成物(実施例1のHIV PCR 反応混合溶液から1:20に希釈)及びTGP ランニングバッファーに1:2,500に希釈したストレプトアビジナルカリホスファターゼコンジュゲート(Enzymatix, Cambridge, U. K.)と接触させた。二重ラベルDNA 生成物との10分の接触の後、ストリップ22を10分間、このストリップ22の接触部分をTGP バッファーの洗浄溶液と接触させることにより洗った。最後に、このストリップ22をChemiProbe(商標)BCIP/NBT溶液(Orgenic Ltd.より市販)の中に、実施例1に記載の通り5分のインキュベーション時間浸しておいた。

3種類のDNA、即ち、胎盤DNA、CasKi細胞DNA及びブルースクリプトプラスミドDNAの全てが、完全にスルホン化されているとき、捕獲ゾーン32中の可視シグナルの発生を防ぐことが見出された。これらの結果と対照的に、同一のDNAを含むが、そのDNAがスルホン化されていない溶液はシグナルを阻止することができなかった。これらの結果は、ゲノムDNA及びプラスミドDNAの両者が、液体の

イクルは: 94°C で1分のDNA変性、 55°C で1分のアニーニング段階、及び 72°C で1分のDNA伸長段階より成る。増幅反応は20サイクルを経て、 72°C での5分間の伸長に終結させた。ラベル化プライマーを利用する第二PCR段階を下記の手順に従って実施した。 $1\mu\text{l}$ の第一反応混合物を、第一PCR反応のそれと同一の反応混合物(ただし、非ラベルプライマーではなく、ラベル化されたもの) $100\mu\text{l}$ の含む6レプリケートそれぞれに加えた。各レプリケートを0, 10, 20, 25又は30サイクルにわたって増幅し、次いで 4°C で保存した。

PCR 生成物の検出

1. 臭化エチジウム-EtdBr-による検出。

増幅後、 $10\mu\text{l}$ のPCR混合物を8%の未変性(TEA)トリス-酢酸バッファーポリアクリルアミドゲル上で電気泳動し、そして50mAで1時間電気泳動にかけた。ゲルを $10\mu\text{g}/\text{l}$ の臭化エチジウム(EtdBr)の中に15分浸し、そしてDNAをUV光により目視した。

2. サザンブロットによる検出。

電気泳動による分離後、泳動したPCRフラグメントを、トランスブロットセル(Bio-Rad, Richmond, CA, USA)の中で1.5 Ampにて3時間にわたり、トランスファーバッファーとしてTAE バッファーを利用して、Hybond-N膜(Amersham, Bucks, U. K.より市販)上にエレクトロブロットした。この膜を風乾し、次いで 80°C で2時間焼いた。

ビオチニル化ラベルの目視は下記のように実施した: 膜を、1-light (Tropix, MA, USA)及び0.1%のツイーン20の添加されたPBSによりブロックした。このナイロン膜を、1:2,500に希釈したストレプトアビジナルカリホスファターゼコンジュゲートの添加された同一のブロッカーの中で1時間インキュベートし、その後PBSの中の0.1%のツイーン20を含む溶液により洗った。最後に、

キャピラリー移動によってニトロセルロース担体伝いに輸送されうること、並びにこのDNAがニトロセルロースストリップ上の適当な捕獲部位にて濃縮されうることを示唆している。

上記の結果は、サンプル中の標的DNAの存在が、標的DNAがスルホン化され、且つ前述の通り二重ラベルDNAを捕獲する前に捕獲ゾーンに結合されているとき、二重ラベルPCR生成物により生成されるシグナルの低下によって検出されうることも示唆している。

実施例3

検出系の比較

HPVのE6遺伝子におけるプライマーを選び、これはその数示内容を引用することで本明細書に組入れるイスラエル特許出願第097226号に記載のHPV16, HPV18及びHPV33の共通プライマーである。それらのプライマーは下記の配列を有する:

プライマー h15' AAGGGAGTAACCGAATCGGT

プライマー h25' ATAATGCTATATTCATAAT

プライマー合成及びラベル手順は実施例1に記載の通りである。これらの手順に従ってプライマーh1はスルホン化し、そしてプライマーh2はビオチニル化した。

HPV DNA 配列の増幅及びラベリング

100 pmoleのラベル化又は未ラベルプライマー、HybriComb(商標)HPキット(Orgenic Ltd.より市販)の仕様書に従って顆粒生検から抽出した $1\mu\text{g}$ のDNA、0.25mMのデオキシヌクレオチド三リン酸(dNTP)、 $10\mu\text{l}$ の10XのTaq バッファー(Promegaより市販)及び2.5単位のTaqポリメラーゼ(Promegaより市販)を含む $100\mu\text{l}$ の反応混合物。この混合物のサーモサイクリングをGrantプログラム可能浴槽で実施した。

未ラベルプライマーを用いて第一PCR段階を実施した。各増幅サ

この膜をChemiProbe(商標)BCIP/NBT染色溶液の中に30分浸し、そして過剰の染色物を水ですすいだ。

3. 固相支持体捕獲(ディップスティック)アッセイによる検出。

ディップスティック捕獲アッセイのための固相支持体として非吸水性インパクトポリスチレン(Orgenic Ltd.より市販)を使用した。ディップスティックの製造。PBS中の $2\text{mg}/\text{ml}$ の精製マウスモノクローナル抗-改質化DNAの溶液 $1\mu\text{l}$ をディップスティックの下部に適用し、次いで 37°C で1時間乾かした。その未結合の部位も、このディップスティックを1%のゼラチン及び0.05%のツイーン20の溶液の中に1時間浸すことによってブロックした。このディップスティックを次に水の中で2~5秒間洗い、そして 37°C で1時間乾かした。

アッセイ:

第二PCRサイクルグループそれぞれに由来する $5\mu\text{l}$ の反応混合溶液を、ストレプトアビジナルカリホスファターゼコンジュゲートを含む $45\mu\text{l}$ のTGP ランニングバッファーに加えた(1:200)。この溶液をウェルに入れ、次いでこのディップスティックをこの溶液の中に浸した。30分のインキュベーション後、このディップスティックをPBSの中で洗い、そしてBCIP/NBT溶液の中に20分浸した。反応はこのディップスティックを水で洗うことにより停止させた。

4. キャピラリーDNA濃縮アッセイ(CDCA)による検出。

第二PCRサイクルグループそれぞれに由来する各反応混合溶液 $3\mu\text{l}$ を、TGP ランニングバッファーの中に1:2,500に希釈されたストレプトアビジナルカリホスファターゼコンジュゲートを含む溶液 $30\mu\text{l}$ を含んでいるウェルに加えた。実施例1の通りにニトロセルロースストリップを調製した。ストリップ22の接触部分20をこのウェルの中の溶液と10分間接触させた。このストリップ20の接触

部分を次に50 μ lの洗浄溶液(TPバッファー)を含むウェルに10分間接触させておいた。最後に、このストリップ22を、発色反応のための基質を供するChemiProbe(商標)BCIP/NBT溶液の中に5分間完全に浸しておいた。

上記の手順の結果を表1に示し、これらは、前述のアッセイ-EtdBr, サザンブロット、固相支持体捕獲アッセイ及びCDCAについてのPCRサイクル数に関する検出限界を示す。

表 1
いくつかの系の検出限界

| System | PCR サイクル数 | | | | | |
|-----------|-----------|----|----|----|----|----|
| | 0 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 |
| Etd/br | - | - | ± | + | + | + |
| サザンブロット | - | ± | + | + | + | + |
| ディップスティック | - | - | ± | + | + | + |
| CDCA | - | + | + | + | + | + |

±=域値レベル

-=絶対陰性

+ =絶対陽性

表1からわかる通り、ディップスティック検査の感度はEtdBr蛍光検査のそれと似ており、両者ともサザンブロット技術より感度が低かった。CDCAはサザンブロット技術と少なくとも同程度の感度であることが認められた。

実施例4

CDCA手順の感度に及ぼす増幅後のプライマー排除の効果

特異的なHIV配列を陽性HIVサンプルから、100 μ lの反応混合

(TE)をウェルに移し、過剰のTEを濾紙で吸収した。15 μ lの各PCR反応混合物をTGPランニングバッファーで1:1に希釈し、そしてこの混合物をウェルの底に直接載せた。

実施例1に記載の通りに用意した。吸収部位がブロックされているニトロセルロースストリップを含むストリップ22の接触部分20を、Sephadex G-100の上側と25分接触させた。このストリップ22の接触部分を次にウェル中のTGPランニングバッファーの中に1:2,500に希釈したストレプトアビジンアルカリホスファターゼコンジュゲートと10分接触させ、次いで洗い、そして実施例1に記載の通りに目視した。

アッセイ4。

第四アッセイにおいては、プライマーをPCR反応混合物から、化合物に結合した相補性オリゴヌクレオチド配列に対するこのプライマーのハイブリダイゼーションによってCDCAの前に除去した。各PCR増幅サイクル数のグループのプライマーを、捕捉すべきプライマーの配列に相補性の配列を有するオリゴヌクレオチドでコートされたビーズと接触させることによって捕捉した。

a) 捕捉系の用意。ストレプトアビジンをWoodward, R. B. 及び Eloffson, R. A. (1961) J. Amer. Chem. Soc. 83, 1007-1010の原理に従い、イスラエル特許出願098452号に記載の条件のもとで(その開示内容は引用することで本明細書に組入れる)スチレン/ビニルカルボン酸ビーズ(直径5 μ m, Bangs Laboratories, Inc. Carmel, IN, USAより市販)に結合させた。相補性オリゴヌクレオチド配列 5' TATTCCTAATTGAACTTCAAを合成し、そして実施例1に記載の通りにビオチニル化した。

オリゴヌクレオチドを下記の手順によりビーズに結合させた。100 μ lの1%のコート化ビーズを1mg/mlのビオチニル化オリゴ

物中での実施例1に記載の未ラベルプライマー3及びプライマー100 pmoleを用いる20PCRサイクルにより増幅させた。第二増幅は第一増幅と同じ条件で実施したが、ただしラベル化プライマーを用いて、そして2, 4, 6, 8, 10及び20サイクルに付した。第二PCR増幅のための鋳型は、100 pmoleの各ラベル化プライマー、0.25mMの4種類のデオキシヌクレオチド三リン酸、10 μ lの10XのTaqバッファー(Promega)及び2.5 UのTaqポリメラーゼ(Promega)を含む反応混合物100 μ lに希釈した第一PCR混合物1 μ lとした。各PCR増幅サイクル数に関して、4アリコートの100 μ lのPCR反応混合物を各アッセイについて検査した。

アッセイ1。

第一アッセイは実施例3に記載のCDCA系とした。各PCR増幅サイクル数のグループからの3 μ lの反応混合物を、TGPランニングバッファー中の30 μ lのストレプトアビジンアルカリホスファターゼを含むウェルに加え、そしてCDCAを実施例3に記載の通りに実施した。

アッセイ2。

第二アッセイにおいて、PCR反応混合物をPEGで処理してCDCAを実施する前にプライマーを除去した。各PCR増幅サイクル数のグループのプライマーは実施例1に記載の通りにPEG溶液を利用して排除した。3 μ lのPEG処理PCR増幅混合物を30 μ lのTGPランニングバッファーに加え、次いでアッセイを実施例3の通りに実施した。

第三アッセイにおいては、PCR反応混合物中のプライマーはCDCAの前にSephadex G-100により排除した。各PCR増幅サイクル数のグループのプライマーをSephadex G-100により下記の通りに排除した。Sephadex G-100 (Pharmacia)中の0.5 μ lのトリスEDTバッファー

ヌクレオチドの溶液と1:1で混合した。この溶液を30℃で3時間インキュベートした。未結合のオリゴヌクレオチドをPBSの中で洗い、そしてPBS中の1%のゼラチン溶液の中で保存した。

b) アッセイ手順。3 μ lの各PCR増幅サイクル数グループを、0.50%の相補性オリゴヌクレオチドコート化ビーズ及びTGPバッファー中のストレプトアビジンアルカリホスファターゼコンジュゲート(1:500に希釈)を含む溶液30 μ lを含んでいるウェルに加え、そして10分間インキュベートした。

実施例1の通りに用意した。吸収部位がブロックされているニトロセルロースストリップを含むストリップ22の接触部分20を次に、インキュベート溶液と10分間接触させた。このストリップ22を次に洗い、そして実施例3の通りにシグナルを発生させた。

表2はCDCAの感度に及ぼす増幅後のプライマーの排除の効果を示す。

表 2
アッセイ1-4の検出限界

| 系 | PCR サイクル数 | | | | | |
|-------|-----------|---|---|---|---|----|
| | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| アッセイ1 | | | | | | + |
| アッセイ2 | | + | + | + | + | + |
| アッセイ3 | | | + | + | + | + |
| アッセイ4 | | | | + | + | + |

+ = HIV DNA 配列の検出。

表2からわかる通り、未処理PCR溶液は8サイクルの増幅の後でさえもCDCAアッセイにおいて可視シグナルを提供しなかった。10サ

イクルぐらい経た後のみに、陽性応答が認められた。分離段階又は検査中による増幅後のプライマーの排除は2～6 PCR サイクルのみの後に標的核酸配列の検出を可能にした。各技術によるプライマーの排除はゲル電気泳動及びEtdBr による識別化によって確認した(データは示していない)。

実施例 5

溶液中でのハイブリダイゼーションによる臨床サンプル中の HPV 配列の検出

プローブの用意。一本鎖 HPV 配列を、実施例 3 に記載の HPV プライマー-h1 を利用する非対称性 PCR 増幅によって調製した。増幅のために下記の条件を利用した。実施例 3 に記載の通りに調製した 10 ng の非ラベル HPV PCR 生成物を鋳型として用い、そしてただ一つのプライマー-h1 を増幅のために用いた。実施例 3 に記載の通りにして 50 PCR サイクルを実施した。

次にその一本鎖生成物を 30℃ で 1 時間スルホン化し、次いで ChemiProbe (商標) キット (Organics, Ltd.) の使用のための仕様書に記載の通りに Sephadex G-50 を用いることによって脱塩した。

HPV 配列の増幅

HPV 配列を 2 通りの方法によって臨床サンプルから増幅させた: A) ビオチニル化 h2 プライマー及び非ラベル h1 プライマーを使用、並びに B) ビオチニル化 h2 プライマー及びスルホン化 h1 プライマーを使用。両方の方法に関し、PCR は実施例 3 に記載の通りにして、35 サイクル行った。

ハイブリダイゼーション

方法 A の PCR 反応混合溶液 5 μ l (35 サイクル後) を、0.66 M の NaCl, 65 mM のクエン酸ナトリウム、0.3 M の EDTA, 0.1 M のリン酸バッファー pH 6.6, 0.02% のフィコール (商標), 0.2% のポリビ

マーを排除した。この溶液 3 μ l を 1.0% のゼラチン、0.3% の Tween 20 及び 0.25 M の NaCl 中の 0.05% のストレプトアビジン結合化ビーズを含むウェルに加えた。実施例 3 に記載の通りに調製したストリップ 22 の接触部分 20 をウェルの中に、このウェル中の溶液を接触するようにして入れた。数分後、青色のシグナルがストリップ 22 の捕獲ゾーン 32 において識別された。

実施例 7

捕獲試薬として DNA を利用するキャピラリー DNA 濃縮アッセイにおける HPV 配列の検出

a) プライマーの選択

HPV/16 の E6 遺伝子におけるプライマーを選び、そして下記の配列を有する:

プライマー 1

5' AAGGGCGTAACCGAAATCGGT

プライマー 2

5' GTTGTTTGCAGCTCTGTGC

b) オリゴヌクレオチドプローブ捕獲試薬

捕獲試薬として働くオリゴヌクレオチドプローブを、PCR 反応におけるプライマー 2 の伸長により生成されるビオチニル化鎖の配列と相補性となるように選んだ。下記の配列を選んだ:

CAACAACAACAGTTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCC

c) ニトロセルロース支持ストリップの用意

孔径 5 ミクロンのマイレレッドニトロセルロース (Micron Separation Inc., Westboro, MA, USA) を 0.5 \times 3.0 cm のストリップに切った。10X の SSC (SSC は 0.15 M の NaCl 及び 0.015 M のクエン酸ナトリウム、pH 7.0 より成る) 中の 5 ng のオリゴヌクレオチドプローブ捕獲試薬より成る溶液 1 μ l を、各ニトロセルロースストッ

ニルピロリドン、0.5% のポリエチレングリコール、0.12% の牛血清アルブミン及び 100 ng の上記のスルホン化プローブを含むハイブリダイゼーション溶液 95 μ l に加えた。この溶液を 95℃ で 5 分熱し、次いで急冷した。ハイブリダイゼーションを 65℃ で 45 分間行った。

CDCA による捕獲

ハイブリダイゼーション完了後の 3 μ l のハイブリダイゼーション混合物又は方法 B 由来の 0.3 μ l の PCR 反応混合溶液を、TGP ランニングバッファー中のストレプトアビジンアルカリホスファターゼ 30 μ l を含むウェルに加えた。実施例 1 に記載の通りに用意したニトロセルロースストリップを含むストリップ 22 の接触部分 20 をこのウェル中の溶液と 10 分接触させ、ハイブリドを捕獲し、そして実施例 3 の通りに目視した。

結果

12 サンプルを評価した。試験した両方の方法に関して、同一の 5 つのサンプルは陽性であり、そして同一の 7 つのサンプルは陰性であった。

実施例 6

発色剤としての着色ラテックスビーズを用いる CDCA 系における HPV の検出

ストレプトアビジン (Sigma) を 0.2 μ m のスチレン/ビニルカルボン酸着色ラテックスビーズ (Bangs Laboratories Inc., Carmel, IN, USA) に共有結合させた。この結合は実施例 4 に記載の通り Woodward らの方法によって達成せしめた。

HPV 配列を含むと予測される臨床サンプル由来の PCR 生成物を、実施例 3 に記載の通りに h-1 スルホン化及び h-2 ビオチニル化プライマーを用いて第二 PCR 増幅工程によって増幅させた。実施例 1 に記載の通りに PEG 溶液を利用して PCR 反応混合溶液からプライ

ブの中央にスポットを形成するように適用した。次にこれらのストリップを 37℃ で 15 分間乾かし、次いでオリゴヌクレオチドプローブを、これらのストリップを 5 分間の UV 照射に暴露することによってニトロセルロースストリップに固定させた。

d) HPV 配列の増幅

PCR 増幅は、1 μ g の正常ヒト胎盤 DNA の存在下で 1,000, 100, 10, 1 又は 0 pg の CasKi 細胞 DNA のいずれかを含む 100 μ l のアリコートの反応混合物の中で実施した。各 PCR 反応混合物は更に 100 pmole の各プライマー (P1 及び P2)、0.25 mM の 4 種類のデオキシヌクレオチド三リン酸、10 μ l の 10X の Taq バッファー及び 2.5 U の Taq DNA ポリメラーゼを含んだ。

94℃ で 5 分の第一 DNA 変性段階に続き、94℃ で 1 分の変性、47℃ で 1.5 分のアニーリング及び 72℃ で 1.5 分の伸長、30 サイクルを行った。増幅は 72℃ で 7 分の伸長で終えた。

e) DNA の輸送及び濃縮

標的核酸配列の濃縮及び捕獲は下記のクロマトグラフィーハイブリダイゼーション手順により達成せしめた:

上記の段階 d) において獲得した 50 μ l ずつの PCR 生成物を、0.6 M の NaCl, 20 mM のリン酸バッファー、pH 7.5, 0.02% のフィコール 400 (Sigma, St. Louis, MO, USA), 0.02% のゼラチン及び 1% の PVP より成る 450 μ l のハイブリダイゼーション溶液の中に 1:10 に希釈した。これらのサンプルを 10 分間煮沸し、そして氷上で急冷した。200 μ l ずつの溶液を次に図 1 ~ 4 に示す装置 12 のウェル 14 に移し、そして各ストリップ 22 の接触部分 20 をウェル 14 中の溶液と接触させた。

装置 12 を 37℃ の多湿インキュベーター (相対湿度 90%) の中に 25 分間入れ、次いでその溶液を、吸水性担体 24 を構成しているニトロ

セルロースストリップ伝いに泳動させた。これらのストリップを次に、PBS の中で1:2,500 に希釈された100 μ l のストレプトアビジンアルカリホスファターゼコンジュゲート及び0.3%のツイーン20を含むウェル16の中に20分間入れておいた。これらのストリップを次に150 μ l のPBS 及び0.3%のツイーン20を含む溶液を含んでいるウェルに移した。ストリップ22の接触部分20をこの溶液に37℃で15分接触させておいた。最後にこれらのストリップを、発色反応のための基質を供するChemiProbe (商標) BCIP/NBT溶液の中に37℃で20分浸しておいた。ストリップ22の捕獲ゾーン32における青色のシグナルはHPV DNA の存在を示す。

1 pgのCasKi DNA ほどの低い量で存在しているHPV 配列がこのクロマトグラフィーハイブリダイゼーション手順によって検出できることが見い出された。

本発明は本明細書において特定に示した及び記載したものに限定されないことが当業者にとって明らかであろう。本発明の範囲は下記の請求の範囲によってのみ限定される。

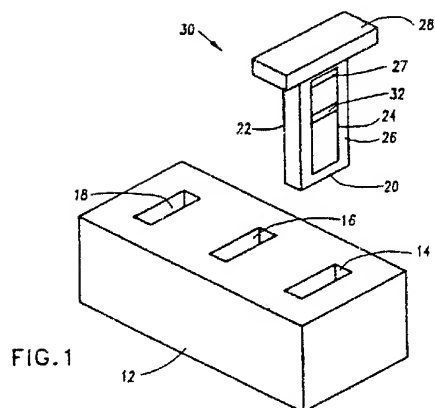


FIG. 1

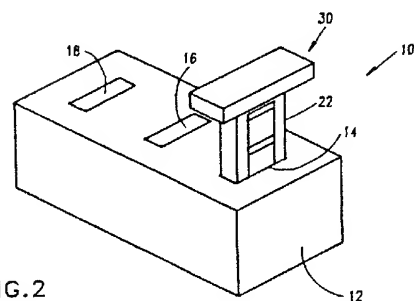


FIG. 2

補正書の翻訳文提出書
(特許法第184条の8)

平成6年4月4日

特許庁長官 麻 生 渡 殿

1 特許出願の表示

PCT/NL92/00176

2 発明の名称

核酸配列の検出のための方法及び装置

3 特許出願人

住 所 イスラエル国、ヤブネ 70650、インダストリアル
ゾーン(番地なし)、ビー、オー、ボックス 360
名 称 オーゲニクス リミティド

4 代 理 人

住 所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号
静光虎ノ門ビル 青和特許法律事務所
電話 (3504)0721

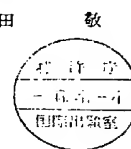
氏 名 弁理士(7751) 石 田 敏

5 補正書の提出年月日

1993年5月3日

6 添付書類の目録

補正書の翻訳文



1 通

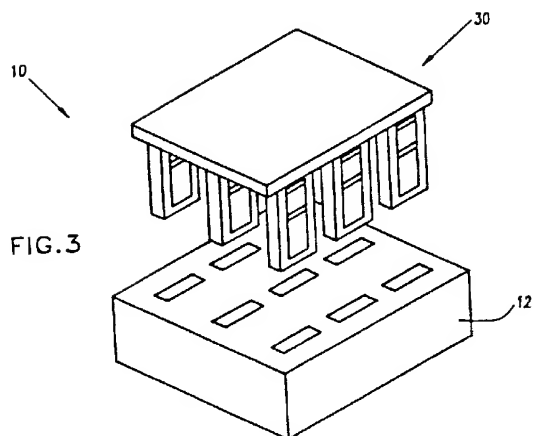


FIG. 3

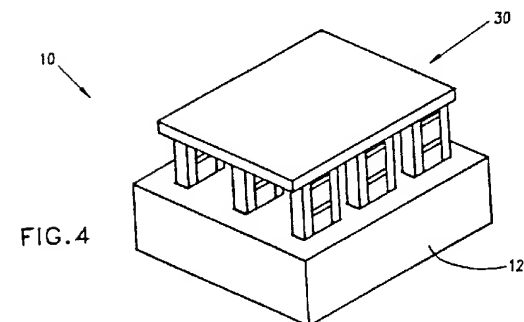


FIG. 4

請 求 の 範 囲

1. ブロックされていない吸水性担体内で核酸配列を含む分子を輸送するための装置であって、該分子を含む溶液と接触しているときに、該分子の輸送を補助するキャピラリー輸送経路を規定するブロックされていない乾燥吸水性担体を含んで成る装置。

2. 液体サンプル中の標的分子の濃縮のための装置であって：

ブロックされていない乾燥吸水性担体（ここで、この標的分子は標的核酸配列を含み、そして前記ブロックされていない吸水性担体内で、キャピラリー作用により、このブロックされていない乾燥吸水性担体がこの標的分子を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）；及び

前記ブロックされていない吸水性担体の接触部分の下流にあるこのブロックされていない乾燥吸水性担体上の少なくとも一捕獲ゾーンにおいて固定化されている少なくとも一捕獲試薬（ここで、この少なくとも一捕獲試薬は標的分子を捕獲することができる）；

を含んで成る請求項1に記載の装置。

3. 標的核酸配列を含む標的分子の、この標的分子と、非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド並びにブロック剤とを含む液体サンプル中の非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドからの分離のための装置であって：

前記非標的オリゴヌクレオチドに結合する化合物を含む槽；及びキャピラリー作用により前記槽から前記標的分子をブロックされていない乾燥吸水性担体に含まれている輸送経路伝いに輸送するための手段；

を含んで成る装置。

4. 前記ブロックされていない吸水性担体がニトロセルロース膜

14. 前記リガンドが抗原性エピトープを含んで成る、請求項13に記載の装置。

15. 前記リガンドが少なくとも一スルホン化シトシンを含んで成る、請求項14に記載の装置。

16. 前記非標的オリゴヌクレオチドが、前記標的核酸配列に一体化されていないオリゴヌクレオチドプライマーを含んで成る、請求項3に記載の装置。

17. 前記化合物が、輸送のための前記手段によって輸送されるのには大きすぎるゲル濾過粒子を含んで成る請求項3に記載の装置。

18. 前記化合物が、輸送のための前記手段によって輸送されないマトリックスを占めており、そしてここで前記化合物が前記非標的オリゴヌクレオチドとハイブリダイズする、請求項3に記載の装置。

19. 吸水性担体の中で増幅標的核酸配列の濃縮のための装置（ここで、この標的核酸配列はこの吸水性担体の中での標的核酸配列の濃縮を助長するサイズとなっている）であって：

この増幅標的核酸配列の輸送を補助するキャピラリー輸送経路を規定する吸水性担体；及び

少なくとも30～500塩基数の核酸配列の増幅領域を含む標的核酸配列；

を含んで成る装置。

20. 核酸配列を含む標的分子の濃縮のための装置であって、核酸配列を含む捕獲試薬が吸水性担体上に、高塩溶液及び紫外照射への暴露によって固定化されている、装置。

21. 増幅標的核酸配列を含む増幅標的分子の濃縮のための装置であって、吸水性担体上に固定化された核酸配列を含む核酸捕獲試薬を含んで成り、ここでこの核酸配列が、この増幅標的核酸配列の少なくとも一部に相補的な核酸プローブを含み、そしてここでこの核

である、請求項2に記載の装置。

5. 前記ブロックされていない吸水性担体がガラスファイバー膜である、請求項2に記載の装置。

6. 前記ブロックされていない乾燥吸水性担体伝いの液体のキャピラリー輸送を助長するために、このブロックされていない吸水性担体に、前記少なくとも一捕獲ゾーンの下流にて吸収パッドが固定されている、請求項2に記載の装置。

7. 前記ブロック剤が、巨大分子、清浄剤及びそれらの組合せを含んで成る群から選ばれる化合物である、請求項2に記載の装置。

8. 前記少なくとも一捕獲試薬が、前記標的核酸配列の改質部分に対する抗体を含んで成る、請求項2に記載の装置。

9. 前記少なくとも一捕獲試薬が、前記標的核酸配列の少なくとも一部に相補的な核酸プローブ配列を含む少なくとも一核酸捕獲試薬を含んで成る、請求項2に記載の装置。

10. 核酸配列を含む前記標的分子が、酵素増幅反応の核酸生成物を含んで成り、そして少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマーを一体化せしめている、請求項2に記載の装置。

11. 前記少なくとも一対のプライマーがポリメラーゼ連鎖反応（PCR）のためのプライマーを含んで成る、請求項10に記載の装置。

12. 前記少なくとも一対のプライマーがリガーゼ連鎖反応（LCR）のためのプライマーを含んで成る、請求項11に記載の装置。

13. 前記少なくとも一対のプライマーのうちの少なくとも第二プライマーが、少なくとも一捕獲試薬に結合するリガンドを抱えるオリゴヌクレオチドを含み、これにより、前記リガンドを抱える前記少なくとも一プライマーを含む前記標的分子が前記少なくとも一捕獲試薬に結合する、請求項10に記載の装置。

核酸プローブが、ラベル化増幅配列において、プライマーの相補性配列から少なくとも5塩基離れている、装置。

22. ブロックされていない吸水性担体内での核酸配列を含む分子の輸送のための方法であって：

核酸配列を含む分子の輸送を補助するキャピラリー輸送経路を規定するブロックされていない乾燥吸水性担体を用意し；そして

この乾燥吸水性担体を核酸配列を含む分子及びブロック剤を含んでいる溶液と接触させること；

の段階を含んで成る方法。

23. 液体サンプル中の、核酸配列を含む分子の濃縮のための方法であって：

ブロックされていない乾燥吸水性担体を用意し（ここで、前記分子は、標的核酸配列を含む標的分子であり、そしてここで、前記分子は、このブロックされていない吸水性担体内で、キャピラリー作用により、このブロックされていない乾燥吸水性担体の一部がこの分子を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）；

前記乾燥吸水性担体の一部を、前記標的分子を含む液体サンプル及びブロック剤と接触させ（ここでこのブロックされていない乾燥吸水性担体は、ブロック剤を含む溶液で濡れているとき、核酸配列を含む分子の輸送を補助する液輸送経路を規定する）；

前記液輸送経路伝いに前記標的分子を輸送し；そして

前記分子を、前記ブロックされていない吸水性担体の前記液体と接触している部分の下流にあるこのブロックされていない乾燥吸水性担体上の少なくとも一捕獲ゾーンにおいて固定化されている少なくとも一捕獲試薬により捕獲すること；

の段階を含んで成る方法。

24. 標的核酸配列を含む標的分子の、この標的分子と、非標的ヌ

クレオチド及びオリゴヌクレオチドとを含む液体サンプル中の非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドからの分離のための方法であって：

前記非標的オリゴヌクレオチドに結合する化合物を含む槽を用意し；

前記標的分子と、前記非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド並びにブロッキング剤とを含む液体サンプルを加え；そして

前記分子をキャピラリー作用により輸送すること；

の段階を含んで成る方法。

25. 標的核酸配列を含む標的分子の、この標的分子と、非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド並びにブロッキング剤とを含む液体サンプル中の非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドからの分離、この標的分子の濃縮、並びに濃縮標的分子の検出のための装置であって：

前記非標的オリゴヌクレオチドに結合する化合物を含む複数ウェルの第一領域を含む複数のウェルを規定する槽備品（ここで前記液体サンプルをこの複数のウェルの第一領域に加えることができる）；

ブロッキング剤を含む溶液で濡れているときに前記標的分子の輸送を補助する、前記槽からの液輸送経路を規定するブロックされていない乾燥吸水性担体（ここで前記標的分子はこのブロックされていない吸水性担体内で、キャピラリー作用により、このブロックされていない乾燥吸水性担体の接触部分がこの標的分子及びブロッキング剤を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）；

前記標的分子を捕獲できる少なくとも一捕獲試薬（ここでこの少なくとも一捕獲試薬は、このブロックされていない吸水性担体の接触部分の下流にあるこのブロックされていない乾燥吸水性担体上の少なくとも一捕獲ゾーンにおいて固定化されている）；並びに

及びブロッキング剤を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）；

ハイブリダイゼーションによって前記標的核酸配列を捕獲するための核酸プローブ配列を含む少なくとも一核酸捕獲試薬（ここで、この少なくとも一核酸捕獲試薬はこのブロックされていない吸水性担体の接触部分の下流にあるこのブロックされていない乾燥吸水性担体上の捕獲ゾーンにおいて固定化されている）；及び

前記の捕獲された標的核酸配列を検出するための手段；

を含んで成る装置。

28. 吸水性担体の中で増幅標的核酸配列を濃縮するための方法（ここで、この標的核酸配列はこの吸水性担体の中で標的核酸配列の濃縮を助長するサイズとなっている）であって：

この増幅標的核酸配列の輸送を補助するキャピラリー輸送経路を規定する吸水性担体を用意し；そして

少なくとも30～500塩基数の核酸配列を供するようにこの標的核酸配列の少なくとも一部を増幅させること；

を含んで成る方法。

29. 核酸配列を含む標的分子の濃縮のための方法であって、核酸配列を含む捕獲試薬を吸水性担体上に、高温溶液及び紫外照射への暴露によって固定化させる段階を含んで成る方法。

30. 増幅標的核酸配列を含む増幅標的分子の濃縮のための方法であって、吸水性担体上に核酸配列を含む核酸捕獲試薬を固定化する段階を含んで成り、ここでこの核酸配列が、この増幅標的核酸配列の少なくとも一部に相補的な核酸プローブを含み、そしてここでこの核酸プローブが、ラベル化増幅配列において、プライマーの相補性配列から少なくとも5塩基離れている、方法。

31. 液体サンプル中の、核酸配列を含む分子の濃縮のための方法

この捕獲標的分子を検出するための手段；

を含んで成る装置。

26. 液体サンプル中の標的核酸配列の濃縮及び検出のための方法であって：

ブロックされていない乾燥吸水性担体を用意し（ここで、この標的核酸配列はこのブロックされていない乾燥担体内で、キャピラリー作用により、このブロックされていない乾燥吸水性担体の一部がこの標的核酸配列及びブロッキング剤を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）；

前記ブロックされていない乾燥吸水性担体の一部を、前記標的核酸配列及びブロッキング剤を含む液体サンプルと接触させ（ここで、この吸水性担体は、ブロッキング剤を含む溶液で濡れているとき、この標的核酸配列の輸送を補助する液輸送経路を規定する）；

前記標的核酸配列を前記液輸送経路伝いに輸送し；

前記標的核酸配列を、前記液体サンプルと接触しているこのブロックされていない吸水性担体の部分の下流にあるこのブロックされていない乾燥吸水性担体上の少なくとも一捕獲ゾーンにおいて固定化されている少なくとも一核酸捕獲試薬とのハイブリダイゼーションにより捕獲すること；

の段階を含んで成る方法。

27. 標的核酸配列の濃縮及び検出のための装置であって：複数のウェルを規定する槽備品；

ブロッキング剤を含む溶液で濡れているときに前記標的核酸配列の輸送を補助する、前記槽からの液輸送経路を規定するブロックされていない乾燥吸水性担体（ここでこの標的核酸配列はこのブロックされていない吸水性担体内で、キャピラリー作用により、このブロックされていない乾燥吸水性担体の接触部分がこの標的核酸配列

であって：

乾燥吸水性担体（ここで、前記分子は、標的核酸配列を含む標的分子であり、そしてここで、前記分子は、コントロールされた速度でこの吸水性担体内で、キャピラリー作用により、この乾燥吸水性担体の一部がこの分子及びブロッキング剤を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）及びこの吸水性担体中での標的分子の輸送速度をコントロールする手段を用意する；

前記乾燥吸水性担体の一部を、前記標的分子を含む液体サンプルと接触させ（ここでこの乾燥吸水性担体は、濡れているとき、核酸配列を含む分子の輸送を補助する液輸送経路を規定する）；

前記液輸送経路伝いにコントロールされた速度で前記標的分子を輸送し；そして

前記分子を、ブロックされていない吸水性担体の前記液体と接触している部分の下流にあるこのブロックされていない乾燥吸水性担体上の少なくとも一捕獲ゾーンにおいて固定化されている少なくとも一捕獲試薬により捕獲すること；

の段階を含んで成る方法。

32. コントロールのための前記手段がポリビニルピロリドン及びグリセロールを含んで成る群から選ばれる化合物を含んで成る、請求項31に記載の方法。

33. 検出のための前記手段が：

シグナル生成試薬に結合するリガンドを抱える、核酸配列を含む標的分子がその上に固定化されている吸水性担体；及び

この核酸配列を含む標的分子の検出を指標する検出可能シグナルを生成するために、前記リガンドを抱える核酸配列を含む標的分子を前記シグナル生成試薬と接触させるための手段；

を含んで成る、請求項25に記載の装置。

34. 前記標的核酸配列が酵素増幅反応の生成物であり、そして少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマーを一体化せしめている、請求項33に記載の装置。

35. 前記非標的オリゴヌクレオチドが、前記標的核酸配列に一体化されていないオリゴヌクレオチドプライマーを含んで成る、請求項25に記載の装置。

36. 前記少なくとも一対のプライマーがポリメラーゼ連鎖反応(PCR)のためのプライマーを含んで成る、請求項34に記載の装置。

37. 前記一対のプライマーが、リガーゼ連鎖反応(LCR)のためのプライマーを含んで成る、請求項34に記載の装置。

38. 前記少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマーのうちの第二プライマーが、前記少なくとも一捕獲試薬に結合するリガンドを含み、これにより、このリガンドを含む前記標的分子がこの少なくとも一捕獲試薬に結合する、請求項34に記載の装置。

39. 前記リガンドが抗原性エピトープを含んで成る、請求項38に記載の装置。

40. 前記リガンドが少なくとも一スルホン化シトシンを含んで成る、請求項39に記載の装置。

41. 前記少なくとも一対のプライマーのうちの第一プライマーがシグナル生成試薬に結合するリガンドを含み、これにより、このリガンドを含む前記標的分子が、このシグナル生成試薬により生成されるシグナルの存在により検出される、請求項34に記載の装置。

42. 前記リガンドを含む前記標的分子がシグナル発生剤との接触後のシグナル生成試薬により生成されるシグナルの存在により検出される、請求項41に記載の装置。

43. 前記リガンドがビオチニル化ヌクレオチドを含んで成る、請求項41に記載の装置。

を更に含んで成る、請求項27に記載の装置。

56. 前記乾燥吸水性担体が少なくとも一本のストリップを含んで成る、請求項25に記載の装置。

57. 前記第一領域ウェルのそれぞれが、前記標的分子をそれらが捕獲される前記少なくとも一捕獲ゾーンに至るまで輸送するために、各ストリップの接触部分を受け入れるようになっている、請求項56に記載の装置。

58. 前記第二領域ウェルそれぞれが、前記少なくとも一捕獲ゾーンにおける前記標的分子の固定化の後の非特異的に捕獲された化合物の除去のために、前記ストリップを洗浄するために各ストリップの接触部分を受容するようになっている、請求項50に記載の装置。

59. 前記第三領域ウェルのそれぞれが、ストリップ全体を受容するようになっている、請求項51に記載の装置。

60. 接触のための前記手段が：

シグナル生成試薬溶液を含む少なくとも一第三領域ウェル；

前記少なくとも一捕獲ゾーンにおける前記標的分子の固定化を経た少なくとも一ストリップ（ここでこのストリップ全体がシグナル発生剤溶液と、このシグナル発生剤とこの少なくとも一捕獲ゾーンとの接触を可能とするように接触している）；

を含んで成る請求項59に記載の装置。

61. 前記第一領域ウェルそれぞれが、前記核酸配列を、少なくとも一捕獲ゾーンに至るまで輸送する各ストリップの接触部分を受容するようになっている、請求項28に記載の装置。

62. 前記第二領域ウェルそれぞれが、前記シグナル生成試薬を、それが前記標的核酸配列に抱えられたリガンドに結合する前記少なくとも一捕獲ゾーンに至るまで輸送するよう、各ストリップの接触部分を受容するようになっている、請求項53に記載の装置。

44. 前記シグナル生成試薬により生成されるシグナルが、粒子に結合したストレプトアビジンを含んで成る、請求項41に記載の方法。

45. 前記シグナル発生剤との接触後に前記シグナル生成試薬により生成されるシグナルがストレプトアビジン-アルカリホスファターゼコンジュゲートを含む、請求項42に記載の装置。

46. 前記増幅標的核酸配列が、酵素増幅反応の生成物であり、そして少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマーを一体化せしめている、請求項19に記載の装置。

47. 前記少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマーがポリメラーゼ連鎖反応(PCR)のためのプライマーを含んで成る、請求項46に記載の装置。

48. 前記少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマーがリガーゼ連鎖反応(LCR)のためのプライマーを含んで成る、請求項46に記載の装置。

49. 前記した第一領域ウェルがシグナル生成試薬も含む、請求項25に記載の装置。

50. 前記複数のウェルが、洗浄溶液を含む第二領域ウェルを更に含む、請求項25に記載の装置。

51. 前記複数のウェルが、シグナル発生剤溶液を含む第三領域ウェルも含む、請求項25に記載の装置。

52. 前記複数のウェルが、標的核酸配列について検査すべきサンプルを含む第一領域ウェルを含んで成る、請求項27に記載の装置。

53. 前記複数のウェルが、シグナル生成試薬を含む第二領域ウェルを更に含んで成る、請求項27に記載の装置。

54. 前記複数のウェルが、洗浄溶液を含む第三領域ウェルを更に含んで成る、請求項27に記載の装置。

55. 前記複数のウェルが、シグナル発生剤を含む第四領域ウェル

63. 前記第三領域ウェルそれぞれが、前記ストリップ捕獲ゾーンにおける前記標的核酸配列の固定化の後の非特異的に捕獲された化合物の除去のために、前記ストリップを洗浄するために各ストリップの接触部分を受容するようになっている、請求項54に記載の装置。

64. 検出のための前記手段が：

シグナル生成発生剤を含む少なくとも一第四領域ウェル；

前記少なくとも一捕獲ゾーンにおける前記標的核酸配列の固定化及び接触ゾーンのシグナル生成試薬への暴露を経た少なくとも一ストリップ（ここでこのストリップ全体がシグナル発生剤溶液と、このシグナル発生剤とこの少なくとも一捕獲ゾーンとの接触を可能とするように接触している）；

を含んで成る請求項55に記載の装置。

65. 前記第四領域ウェルがストリップ全体を受容するようになっている、請求項64に記載の装置。

66. 特異的な核酸配列の検出のための方法であって：

オリジナルの核酸配列の少なくとも一部に特異的である30～500塩基の核酸配列を含む標的分子を生成するために、このオリジナル核酸配列の少なくとも一部を酵素反応によって増幅し；

この標的分子を、非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドから分離し（ここで、この分離は：

非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドに結合する基体を含む槽を用意し；

前記標的分子と、非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド並びにブロッキング剤及び輸送速度コントロール化合物とを含む液体サンプルを加え；そして

この標的分子、ブロッキング剤及び輸送速度コントロール剤をキ

キャピラリー作用によって輸送する；段階を含む）；

この標的分子を濃縮し（ここで、この濃縮は：

ブロックされていない乾燥吸水性担体を用意する（ここで、この標的分子はこのブロックされていない吸水性担体内で、キャピラリー作用により、コントロールされた速度で、この乾燥吸水性担体の一部がこの標的分子ブロッキング剤及び輸送速度コントロール化合物を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）；

このブロックされていない乾燥吸水性担体の一部を、この標的分子、ブロッキング剤及び輸送速度コントロール化合物を含む液体サンプルと接触させる（ここで、この乾燥吸水性担体は、ブロッキング剤及び輸送速度コントロール化合物を含む液体で濡れているとき、この標的分子の輸送を補助する輸送速度のコントロールされた液輸送経路を規定する）；

この標的分子をこの液輸送経路伝いにコントロールされた速度で輸送し；そして

この標的分子を、この液体サンプルを接触しているブロックされていない吸水性担体の部分の下流にあるこのブロックされていない乾燥吸水性担体上の捕獲ゾーンにおいて固定化されている少なくとも一捕獲試薬により捕獲する；段階を含む）；次いで

この標的分子を検出する〔この検出は：

シグナル生成試薬に結合するリガンドを含む標的分子を用意し；そして

リガンドを有し、且つ捕獲ゾーンにおいて捕獲されている標的分子をシグナル発生剤と接触させて検出可能シグナルを生成する；段階を含む）；段階を含んで成る方法。

67. 特異的な核酸配列の検出のための方法であって；

オリジナルの核酸配列の少なくとも一部に特異的である30～500

塩基の核酸配列を生成するために、このオリジナルの核酸配列の少なくとも一部を酵素反応によって増幅し；

この標的核酸配列非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド、ブロッキング剤及び輸送速度コントロール化合物を含む液体サンプルを用意し；

標的分子、ブロッキング剤及び輸送速度コントロール化合物をキャピラリー作用によって輸送し；

この標的分子を濃縮し〔ここで、この濃縮は：

ブロックされていない乾燥吸水性担体を用意し（ここで、この標的分子はこのブロックされていない吸水性担体内で、キャピラリー作用により、コントロールされた速度で、この乾燥吸水性担体の一部がこの標的分子、ブロッキング剤及び輸送速度コントロール化合物を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）；

このブロックされていない乾燥吸水性担体の一部を、この標的分子、ブロッキング剤及び輸送速度コントロール化合物を含む液体サンプルと接触させ（ここで、このブロックされていない乾燥吸水性担体は、ブロッキング剤及び輸送速度コントロール化合物を含む液体で濡れているとき、この標的分子の輸送を補助する輸送速度のコントロールされた液輸送経路を規定する）；

この標的分子をこの液輸送経路伝いにコントロールされた速度で輸送し；そして

この標的分子を、この液体サンプルを接触しているブロックされていない吸水性担体の部分の下流にあるこのブロックされていない乾燥吸水性担体上の捕獲ゾーンにおいて固定化されている少なくとも一捕獲試薬により捕獲する；段階を含む）；次いで

この標的分子を検出する〔この検出は：

シグナル生成試薬に結合するリガンドを含む標的分子を用意し；

そして

リガンドを有し、且つ捕獲ゾーンにおいて捕獲されている標的分子をシグナル発生剤と接触させて検出可能シグナルを生成する；段階を含む）；段階を含んで成る方法。

68. 特異的な増幅核酸配列の検出のための方法であって；

この標的分子、非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド、ブロッキング剤及び輸送速度コントロール化合物を含む液体サンプルを用意し；

標的分子、ブロッキング剤及び輸送速度コントロール化合物をキャピラリー作用によって輸送し；

この標的分子を濃縮し〔ここで、この濃縮は：

乾燥吸水性担体を用意し（ここで、この標的分子はこの乾燥吸水性担体内で、キャピラリー作用により、コントロールされた速度で、この乾燥吸水性担体の一部がこの標的分子及び輸送速度コントロール化合物を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）；

この乾燥吸水性担体の一部を、この標的分子及び輸送速度コントロール化合物を含む液体サンプルと接触させ（ここで、この乾燥吸水性担体は、輸送速度コントロール化合物を含む液体で濡れているとき、この標的分子の輸送を補助する輸送速度のコントロールされた液輸送経路を規定する）；

この標的分子をこの液輸送経路伝いにコントロールされた速度で輸送し；そして

この標的分子を、この液体サンプルと接触している吸水性担体の部分の下流にあるこの乾燥吸水性担体上の捕獲ゾーンにおいて固定化されている少なくとも一捕獲試薬により捕獲する；段階を含む）；次いで

この標的分子を検出する〔この検出は：

シグナル生成試薬に結合するリガンドを含む標的分子を用意し；

そして

リガンドを有し、且つ捕獲ゾーンにおいて捕獲されている標的分子をシグナル発生剤と接触させて検出可能シグナルを生成する；段階を含む）；段階を含んで成る方法。

69. 特異的な増幅核酸配列の検出のための装置であって；

標的分子、非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド、並びに輸送速度コントロール化合物を含む液体サンプル；

乾燥吸水性担体（ここで、この標的分子は乾燥吸水性担体内で、キャピラリー作用により、コントロールされた速度で、この乾燥吸水性担体の接触部分が標的分子及び輸送速度コントロール化合物を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）；

この液体サンプルを接触しているこの吸水性担体の部分の下流にある、この輸送吸水性担体上の捕獲ゾーンにおいて高塩及び紫外照射により固定されている少なくとも一核酸捕獲試薬を含む、標的分子を捕獲するための手段；並びに

この捕獲された標的分子を検出するための手段；

を含んで成る装置。

国際調査報告

PCT/NL 92/00176

| | | | |
|--|---|-------------------------------|-------------------------|
| I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | International Application No. | PCT/NL 92/00176 |
| According to International Patent Classification (IPC) or to its previous version and/or to International Patent Classification (IPC) | | | |
| Int. Cl. 5 C12Q1/68; | | G01N33/558; | G01N33/543; // C12Q1/70 |
| B. FIELD OF RESEARCH | | | |
| Minimum Classification Symbol(s) | | | |
| Classification System | | Classification System | |
| Int. Cl. 5 | | C12Q ; G01N | |
| Determination Symbol(s) other than Minimum Classification Symbol(s) to the extent that such Symbol(s) are indicated in the Patent Document(s) | | | |
| II. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ¹ | | | |
| Category ² | Character of Document, if indicated, where appropriate, of the relevant passages ³ | Relevant to Claim No. 1 | |
| X | EP,A,0 262 328 (ABBOTT LABORATORIES) 6 April 1988 see page 9, line 1 - page 15, line 52 see page 28, line 35 - line 47 see page 32, line 10 - page 33, line 52 see page 41, line 20 - page 42, line 50; claims --- | 1-5, 23-25, 27,49,50 | |
| X | EP,A,0 306 336 (SYNTEX (USA) INC.) 8 March 1989 see page 5, line 2 - line 19 see page 7, line 56 - page 8, line 18 see page 11, line 50 - page 12, line 39 see page 19, line 60 - page 21, line 61; claims --- | 1 | |
| - | | | |
| ¹ Special categories of cited documents: ^{1a} ^{1b} ^{1a} Documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ^{1b} Documents not published as or after the International Filing Date ^{1c} Documents which may have priority claims (or which are cited to establish the priority claim of another document or which are cited as prior art) ^{1d} Documents relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means ^{1e} Documents published prior to the International Filing Date but later than the priority date claimed ² ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} ^{2q} ^{2r} ^{2s} ^{2t} ^{2u} ^{2v} ^{2w} ^{2x} ^{2y} ^{2z} ^{2a} ^{2b} ^{2c} ^{2d} ^{2e} ^{2f} ^{2g} ^{2h} ²ⁱ ^{2j} ^{2k} ^{2l} ^{2m} ²ⁿ ^{2o} ^{2p} | | | |

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, SN, TD, TG), AT, AU, BB, BG, BR, CA, CH, CS, DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, KP, KR, LK, LU, MG, MN, MW, NL, NO, PL, RO, RU, SD, SE, US

(72)発明者 エルズベール, マクス
イスラエル国, 73272, モシャブ サタリヤ (番地なし)